

발간등록번호

11-1543000-002003-01

상황버섯으로 유도된 FMO3와 Corin에 의한
농약분해 및 혈압저하 유도
(Induction of FMO3 and Corin by *Phellinus baumii*
and Its Application in Pesticides Metabolism and
Hypertension Treatment)

서울시립대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “상황버섯으로 유도된 FMO3와 Corin에 의한 농약분해 및 혈압저하 유도”(개발기간 : 2014. 09. ~ 2017. 09.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. .

주관연구기관명 : 서울시립대학교 산학협력단 (인)

주관연구책임자 : 김 하 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114074-3	해당단계 연구기간	2014.09.25 ~ 2017.09.24	단계구분	3년/3년
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	상황버섯으로 유도된 FMO3와 Corin에 의한 농약분해 및 혈압저하 유도			
	세부과제명	상황버섯으로 유도된 FMO3와 Corin에 의한 농약분해 및 혈압저하 유도			
연구책임자	김하원	해당단계 참여 연구원 수	총: 6명 내부: 5명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 0천원 계: 50,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 7명 외부: 1명	총연구개발비	정부: 150,000천원 민간: 0천원 계: 150,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울시립대학교 생명과학과			참여기업명: (해당없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당없음)			연구책임자: (해당없음)	
<p>상황버섯의 베타-글루칸을 마우스에 경구투여하였을 때 간조직에서 FMO, Corin, Metallothionein의 3종의 유전자가 투여일수에 비례하여 증가하였다. 5종의 FMO 유전자중에서 FMO2, FMO3, FMO4 가 크게 증가하였으며 대표적으로 FMO3가 증가되어 동물에서 소변중의 약취물질인 TMA 분해촉진과 생체외래물질(xenobiotics)인 carbendazim 농약 분해촉진을 증명하였다. 베타-글루칸에 의하여 증가된 Corin은 ANP를 생산시켜 새로운 항암작용 기전을 밝혔으며, 신장에서 나트륨의 배설을 촉진시킴을 입증하여 혈압저하 기전을 증명하였다. 증가된 Metallothionein에 의하여 체내의 중금속인 Pb와 Cd의 배설촉진을 증명하였다.</p>				<p>보고서 면수: 104면</p>	

< 국문 요약문 >

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>국내농가의 소득을 향상시키고 국내에서 주로 재배하는 상황버섯 (<i>Phellinus baumii</i>)의 부가가치를 높이기 위하여, 상황버섯의 베타-글루칸에 대하여 새로운 접근방법으로 연구하였다. 지금까지 버섯의 베타-글루칸의 주요 작용은 면역촉진과 항암작용이었다. 그러나 본 연구자는 상황버섯의 베타-글루칸의 새로운 효능을 발견하기 위하여 베타-글루칸을 마우스에 경구투여하여 크게 증가하는 유전자를 발견하여 그 효능을 증명하고자 하였다. 상황버섯의 베타-글루칸을 마우스에 경구투여한 후에 간조직으로부터 총 mRNA를 분리하여 마이크로어레이법으로 분석하여 크게 증가된 유전자 3종을 발견하였다. 증가된 유전자를 리얼타임 PCR로 재확인하였을 때도 동일하게 증가함을 증명하였다. 3종의 유전자에 대하여 그 유전자의 기능을 실험동물을 통하여 증명함으로써 체계적인 연구가 완성되었다.</p>					
연구개발성과	<p>상황버섯 추출물 또는 베타-글루칸 분획에 대하여 새로운 효능을 발견하기 위하여 마우스에 경구투여한 후에 간조직을 추출하여 마이크로어레이법으로 크게 증가된 유전자는 FMO, Corin, Metallothionein의 3종 유전자임을 밝혔다. 베타-글루칸을 경구투여후 리얼타임 PCR분석에 의하여 FMO 유전자중에서 FMO2, FMO3, FMO4 가 증가하였으며 대표적으로 FMO3가 크게 증가됨을 밝혔다. 증가된 FMO 유전자는 마우스 소변중의 약취물질인 TMA의 농도가 감소하였을 뿐만 아니라 체내로 주입한 농약인 carbendazim의 혈청내 농도도 신속하게 감소시켰다. 베타-글루칸에 의하여 증가된 Corin 효소는 pro-ANO를 ANP로 전환시킴을 밝혀냈다. 증가된 ANP는 Wnt 수용체에 결합하여 항암작용을 나타내는 기전이 됨을 밝혔다. 지금까지는 베타-글루칸이 체내의 면역을 증강시켜 항암작용을 나타낸다고 알려져 왔으나, 또 다른 항암기전으로 Corin효소를 증가시켜 항암작용을 나타냄을 밝혔다. 증가된 Corin효소의 또 다른 작용으로 신장에서 나트륨의 배설을 촉진시킴을 입증하여 혈압저하 기전을 증명하였다. 베타-글루칸을 경구투여 한 후에 간에서 Metallothionein (MT) 단백질이 증가함을 리얼타임 PCR로 증명하였으며, 증가된 MT에 의하여 마우스의 각종 조직에서 Pb와 Cd의 배설을 촉진시킴을 증명하였다. 본 과제를 통하여 세계 최초로 베타-글루칸이 FMO, corin, metallothionein을 증가시킴을 발견하는 성과를 이룩하게 되었다.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>본 과제를 통하여 상황버섯의 새로운 작용을 밝혔으므로 아래와 같은 다양한 실용화가 달성 될 수 있다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) FMO3 관련: 인체농약 제거제, 니코틴분해 촉진제, 오리농장의 악취감소제, 애완동물의 냄새제거제 등의 제품개발. 2) Corin 관련: 무독성 혈압저하제 개발, 심장마비 예방제 개발, 항암제개발. 3) MT 관련: 납 또는 카드뮴 등의 생체내 유해중금속 제거제 개발. <p>그러므로, 상황버섯의 베타-글루칸에 대하여 새로운 효능을 발견하였으므로 국내 버섯재배 농가의 소득증대에 크게 기여할 것으로 예상된다.</p>					
중심어 (5개 이내)	베타-글루칸	FMO	Corin	Metallothionein	중금속제거	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>In order to improve income of domestic farm house and to enhance value of cultivated mushroom products of <i>Phellinus baumii</i>, we investigated new approach by using beta-glucan from the mushroom. Most of the reported functions of beta-gluca has been immunostimulation and anticancer activity. However, to find novel functions of beta-glucan from <i>Phellinus baumii</i>, we approached finding increased genes and prove the efficacy of the induced genes by the oral administered beta-glucan in mouse. Total mRNAs were isolated from mouse liver tissue and found three increased genes by the microarray method. The augmented genes were also reconfirmed by realtime PCR analysis. The new functions by the increased genes were completed systemically in experimental animal.</p>					
Results	<p>We found three genes of FMO, corin and metallothionein from the mouse liver tissue that was orally administered beta-glucan. Among the FMO family, realtime PCR analysis showed that FMO2, FMO3 and FMO4 isotypes were increased, especially FMO3 was most strongly augmented. The induced FMOs decreased odor compound of TMA in urine and increased excretion of pesticide from the serum. We found increase of ANP by the induced corin enzyme. The binding of ANP to Wnt receptor could be novel antitumor mechanism. The increased corin enzyme augmented secretion of Na⁺ from the kidney, showing an antihypertensive activity. Orally administered beta-glucan also promoted excretion of heavy metals of Pb and Cd metals in mouse organs. We are the first reporter in the world induction of FMO, corin, metallothionein genes by beta-glucan in this project.</p>					
Expected Contribution	<p>As we found novel functions of <i>Phellinus baumii</i> in this project, the following applications could be achieved:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) FMO3 field: Rapid clearance of pesticides, rapid nicotine clearing agent, deodorizer in pet and livestock raiser. 2) Corin field: Development of non-toxic antihypertensive drug, heart attack preventing drug and antitumor agent. 3) MT field: Development of toxic heavy metal scavenger including lead or cadmium. <p>Therefore, it is expected to contribute greatly to increase income of domestic mushroom grower due to the finding new functions of beta-glucan from <i>Phellinus baumii</i>.</p>					
Keywords	beta-glucan	FMO	Corin	Metallothionein	heavy metal	

< Contents >

Chapter 1: Overview of Research and Development Project	7
Chapter 2: Research Trends of Technic Development in Domestic	9
Chapter 3: Methods and Results of the Accomplished Research and Development ..	20
Chapter 4: Degree of Object Achievements and Degree of Contribution to Related Field	75
Chapter 5: Achievement of Research and Development and Plan for Achievement Application	78
Chapter 6: Obtained Foreign Informations on Scientific Techniques during Research and Development	80
Chapter 7: Security Level of the Achievement of Research and Development	81
Chapter 8: Present List of Research Facilities and Equipments	82
Chapter 9: Safeguard Performance in Laboratory during Research and Development Project	83
Chapter 10: Typical Research Achievement List on the Research and Development Project	84
Chapter 11: Miscellaneous	85
Chapter 12: References	86

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 2 장 국내의 기술개발 현황	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	75
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	78
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	80
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	81
제 8 장 연구시설·장비 현황	82
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	83
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	84
제 11 장 기타사항	85
제 12 장 참고문헌	86

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

지금까지 벼섯의 베타-글루칸의 주요 작용은 면역촉진과 항암작용이었다. 그러나 본 연구자는 실험동물인 마우스에 상황벼섯의 베타-글루칸 경구투여에 의하여 FMO3 유전자와 Corin 단백질의 발현이 증가함을 최초로 발견하여 아래의 연구를 중점적으로 규명하고자 함.

- 베타-글루칸의 FMO3증가에 의한 농약, 제초제 분해촉진, 또한 오리 및 애완견 냄새 제거.
- 베타-글루칸의 Corin증가에 의한 혈압저하작용, 혈관확장 및 심장마비억제 등 작용기전 해명.
- 베타-글루칸의 MT(metallothionein) 증가에 의한 체내 중금속제거 및 ROS제거 기능 규명

1-2. 연구개발의 필요성

베타-글루칸에 의하여 FMO3, Corin, MT 유전자의 발현이 증가한다는 사실은 본 연구자가 최초로 밝혀내었으므로 특허로 출원이 가능하며, 산업화를 시킬 수 있는 큰 장점이 있다. 또한 학술적으로도 매우 의의있는 발견이므로 논문을 작성하여 투고하면 SCI급 저널에 쉽게 게재될 수 있을 것이다.

1-3. 연구개발 범위

- 상황벼섯의 베타-글루칸에 의한 FMO3 유전자의 발현 및 작용
 - 마이크로어레이 분석을 통해 FMO3 유전자의 발현 규명
 - Mouse에 경구 투여 후 PCR을 통해 조직별 생체 내 FMO3 유전자의 발현을 보기위한 *in vivo* 실험 진행
 - HPLC 실험을 통해 농약 및 니코틴의 체외 배출 분석
- 상황벼섯의 베타-글루칸에 의한 Corin 단백질의 발현 및 작용
 - 마이크로어레이 분석을 통해 Corin 유전자의 발현 규명
 - 상황벼섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 mouse의 조직에서의 Corin 단백질 발현을 분석하기 위해 western blotting 진행
 - 이노작용 확인을 위하여 대사 cage를 이용하여 mouse에서의 소변량 측정
 - Na⁺ 배설 촉진 작용 확인을 위하여 소변 중 Na⁺ 농도를 원자흡광광도법 (Perkin-Elmer A Analyst 600)을 통하여 측정
- 상황벼섯의 베타-글루칸에 의한 metallothionein (MT)의 발현 및 작용
 - 마이크로어레이 분석을 통해 MT의 발현 증가 규명
 - 상황벼섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 mouse의 조직에서의 MT 유전자 발현 증가를 rt-PCR을 통해 규명
 - 수은 또는 카드뮴을 투여 후 혈중 카드뮴과 납 분석은 원자흡광광도법 (Perkin-Elmer A Analyst 600)으로, 혈중 수은 분석은 골드아말감법(DMA-80)을 통해 측정

연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	정량
1차 년도	2014	FMO 유전자의 발현과 효능	● 마이크로어레이를 통해 FMO1 ~ FMO5의 발현 연구	40%
			● 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여 후 동물의 간, 폐, 신장에서 FMO1 ~ FMO5 유전자의 발현 연구	30%
			● 동물에서 니코틴, 농약, 소변중 약취성분 등의 배설촉진 규명	30%
2차 년도	2015	Corin 유전자의 발현과 효능	● 베타-글루칸의 수용체인 decin-1을 가지고 있는 macrophage cell line을 사용하여 세포내에서 Corin 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 분석	30%
			● 상황버섯의 베타-글루칸을 처리한 마우스의 간에서 Corin 유전자 및 단백질 발현 증가를 RT-PCR과 western blotting을 통해 분석	50%
			● 마우스에서 나트륨 배설 촉진	20%
3차 년도	2016	MT 유전자의 발현과 효능	● 마이크로어레이를 통해 MT 유전자의 발현 연구	50%
			● 마우스의 간, 폐, 신장에서 MT 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 분석	30%
			● 중금속 배설효능 분석	20%

제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 상황버섯 베타-글루칸의 효능

가. 상황버섯 베타-글루칸의 효능

상황버섯 (*Phellinus* 속)은 150 여종이 보고되었으며, 분류학적으로 Hymenochaetaceae 에 속한다. 많은 *Phellinus* 속의 상황버섯은 항암 및 항 염증 효과를 발휘하고, 면역력을 높이고, 유해 물질을 해독하고, 혈액 순환을 촉진하는 것으로 보고되었다 (Dai et al., 2010). 이들 종으로부터 추출된 다당류의 항암 기전은 면역 반응의 촉진 (Kim et al., 2004), 종양 세포 사멸의 유도 (Zhu et al., 2007) 및 종양 전이억제 등이다 (Sliva et al., 2008). *Phellinus* 종의 저분자 화합물은 styrylpyrones으로 알려진 노란색 폴리페놀 안료에 의해 매개되어 다양한 생물학적 활성도 나타낸다. *Phellinus* 및 *Inonotus* 속의 styrylpyrones은 항산화작용, 항당뇨효과, 항염증, 항혈소판 응집, 항바이러스 및 항치매 작용 등을 나타낸다 (Lee et al., 2011). *P. linteus*와 *P. baumii*는 아시아에서 잘 알려져있다. *P. baumii* 자실체의 생물학적 활성에 대해서는 거의 알려져있지 않으나, 이 버섯의 일부 성분은 항산화 효과 (Zhang et al., 2015), 저혈당 활성 (Wang et al., 2015), 항 인플루엔자 활성 (Hwang et al., 2015), 리폭시게나제 억제 활성 (Lee et al., 2014), 콜라겐 (II 형) 유도에 의한 관절염의 약화 (Yayeh et al., 2013)와 같은 생물학적 활성을 가지고 있다.

나. 베타-글루칸의 흡수 및 작용 기전

모든 버섯은 항암과 면역 활성물질을 조금씩 함유하고 있다. 그 중 상황버섯이 가장 강력하며 안전한 항암면역효과를 갖고 있다. 상황버섯은 정상세포에 독작용 없이 인체에 약리효과를 나타낸다. 상황버섯의 효능은 polysaccharide의 한 종류로써 β -(1,3), β -(1,4), β -(1,6)의 결합을 이루고 있는 고분자 물질인 베타-글루칸 때문이다. 상황버섯에서 추출한 베타-글루칸의 신약개발의 중요성 및 가능성은 이미 입증되었다. 베타-글루칸은 소장의 M cell을 통해 소장 안으로 들어가서 macrophage나 dendritic cell의 표면에 존재하는 C-type lectin receptor family인 Dectin-1과 결합하여 다양한 면역 cytokine을 조절한다. 상황버섯의 베타-글루칸은 NADPH oxidase를 증가시켜 항진균 작용을 증가시킬 뿐만 아니라 니코틴을 코티닌으로 대사시켜 체외 배출을 도울 것으로 기대되어진다. 최근에는 캄보디아 등의 열대지역에서는 Moraceae 식물의 고목에서 재배한 상황버섯이 타 지역의 상황버섯보다 효능이 다양한 것으로 알려져있지만, 상황버섯의 베타-글루칸인 경우에는 재배하는 고목 또는 주위환경의 영향을 거의 받지 않는

것으로 알려져있다.

다. 생리활성물질 연구현황

상황버섯은 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*의 두 종류가 주로 연구가 진행되고 있다. 상황버섯의 다당체는 항암효과 우수함이 특징이며, 저분자 물질도 다양한 작용을 나타내고 있는바 황색을 띄는 물질이 다양한 약리효과를 나타내고 있다. 이러한 황색물질은 폴리페놀계열의 색소화합물로서 항산화작용, 항당뇨작용, 치매예방작용, 항바이러스작용, 소염작용, 암세포 사멸작용, 혈소판 응집억제작용 등을 나타낸다 (Lee et al., 2010).

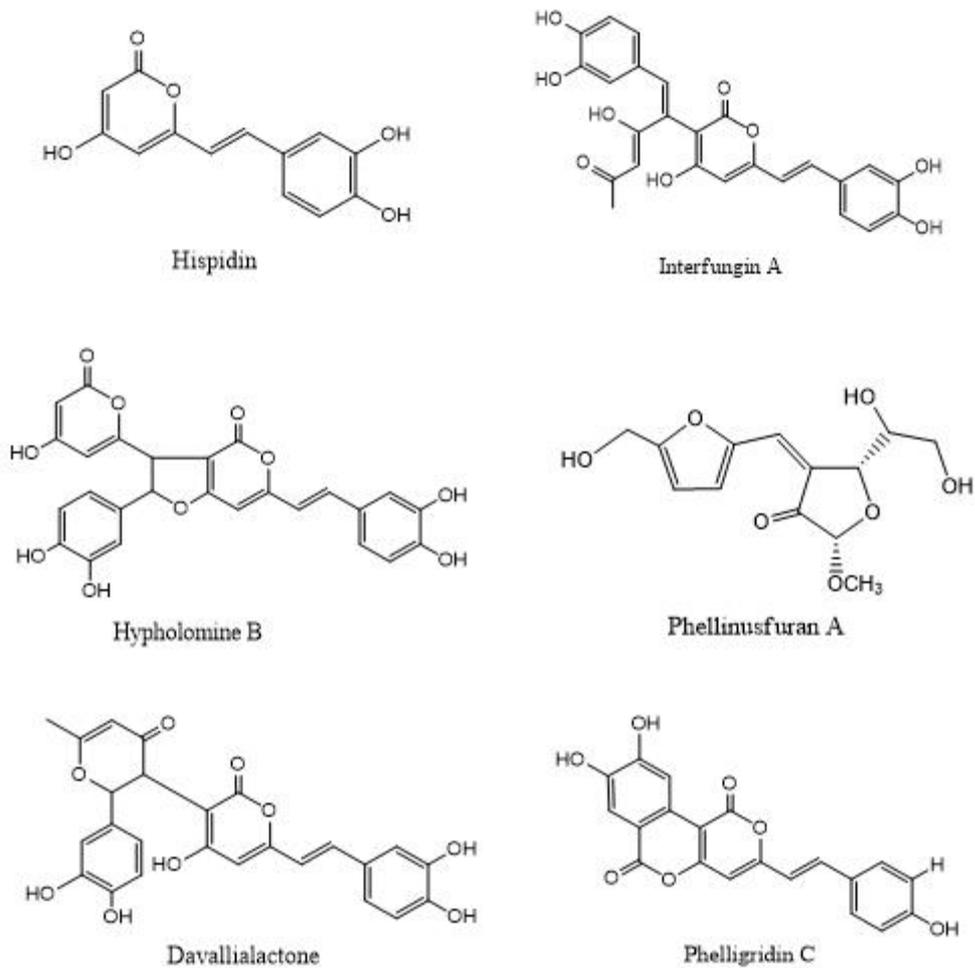


Fig. 2-1. 상황버섯에 함유된 주요 생리활성물질의 화학구조식.

라. 약리작용 연구현황

- (1) 항산화작용: 상황버섯 (*Phellinus linteus*)의 항산화성분으로는 히스피딘(hispidin), 바이히스피디닐(bihispidinyl), 하이포로민 B (hypholomine B) 등의 성분이 알려져 있다. 바이히스피디닐과 하이포로민 B는 히스피딘보다 항산화작용이 더욱 강하다. 항산화작용은 체내의 자유관능기(free radical)를 제거시키는 작용을 나타내어 심장허혈, 뇌허혈, 죽상동맥경화증, 당뇨병, 류마티스성 관절염, 염증, 암, 노화 등을 억제 또는 예방하는 작용을 나타낼 수 있으므로 상황버섯은 이러한 질병에 적용될 수 있다 (Lee et al., 2011).
- (2) 항당뇨작용: 상황버섯에는 당뇨의 합병증을 억제하는 성분이 보고되어 있다. *Phellinus linteus* 상황버섯에서 분리한 인터펄진 A (interfungin A)와 *Phellinus baumii*에서 분리한 다바리아락톤 (davallialactone) 성분은 당뇨병의 합병증을 유발하는 aldose reductase를 강력하게 억제시킴으로써 항당뇨작용을 나타낸다. 인터펄진 A (interfungin A)와 다바리아락톤 (davallialactone)의 aldose reductase에 대한 IC50은 각각 0.56 uM과 1.82 uM이다.
- (3) 치매예방작용: 치매는 알츠하이머질환이라고도 부르며 뇌의 신경세포의 퇴화작용에 의하여 유발된다. 뇌에서 secretase라는 효소에 의하여 beta-amyloid peptide가 축적되어 치매에 걸리게 된다. 린테우스 상황버섯의 균사배양액에서 분리한 히스피딘 (hispidin)이 BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme)이라는 secretase를 강력하게 억제하여 치매진행을 억제시키는 작용을 가지고 있다. 히스피딘의 BACE1 효소에 대한 IC50은 4.9 uM이다.
- (4) 항바이러스작용: 린테우스 상황버섯의 균사배양액에서 분리한 히스피딘(hispidin)은 항바이러스작용을 나타낸다. 히스피딘은 A형 독감(H1N1과 H3N2)과 B형 독감에 효과가 있다. 또한 히스피딘은 에이즈 바이러스(HIV)의 증식도 억제하는 작용을 나타낸다. 히스피딘은 에이즈바이러스의 HIV-1 integrase를 억제하며 IC50은 2 uM이다.
- (5) 소염작용: 상황버섯에는 다양한 염증억제작용을 나타내는 물질이 함유되어 있다. 상황버섯의 히스피딘(hispidin)은 COX-2(cyclooxygenase-2)를 강력하게 억제할 뿐만 아니라 xanthine oxidase의 활성을 억제한다. xanthine oxidase를 억제하면 요산생성을 억제시킬 수 있으므로 요산침착에 의한 관절염을 막을 수 있다. 상황버섯의 하이포로민 B (hypholomine B)와 스쿠아로시딘(squarrosidine) 성분도 xanthine oxidase의 활성을 억제한다. 상황버섯의 펠리누스퓨란(phellinusfuran) A와 B는 보체의 활성화를 억제하여 염증을 차단하는 작용을 나타낸다. 바우미 상황버섯에서 분리된 다바리아락톤(davallialactone) 성분은 LPS에 의해 유도된 염증을 강력하게 억제한다. 즉, 다바리아락톤은 NO 생성 억제, 프로스타글란딘 E2 분비억제, 염증유발 사이토카인 분비억제 등의 작용을 나타내어 소염작용을 나타내는데 그 작용기전은 NF-kB의 인산화를 억제하여 항염증작용을 나타낸다.

(6) 암세포 사멸작용: 상황버섯에는 항암성분도 함유되어있다. 린테우스 상황버섯의 균 사배양액에서 분리한 히스피딘(hispidin)은 PKC-beta를 억제하여 정상세포보다는 암세포를 더 강하게 사멸시키는 작용을 나타낸다. 상황버섯의 펠리그리딘 C (phelligrudin C)와 펠리퓨로피라논 A (phellifuropyranone A)도 사람의 암세포주에 대하여 암세포에 독성작용을 나타낸다.

(7) 혈소판 응집억제작용: 바우미 상황버섯에서 분리된 다바리아락톤(davallialactone) 성분은 혈소판응집억제작용을 나타낸다. 혈소판이 응집되면 중풍의 원인이 되므로 혈소판응집억제제는 중풍의 예방과 치료에 중요하다. 다바리아락톤(davallialactone)은 콜라겐, 트롬빈, ADP 등에 의한 혈소판 응집반응을 모두 억제하며, 그 작용기전은 세포내 Ca⁺⁺억제와 ERK-2와 MAPK의 인산화 억제를 통하여 혈소판 응집억제 작용을 나타낸다.

2. FMO 효소의 연구동향

가. FMO 유전자의 종류와 기능

Flavin-containing monooxygenase (FMO)은 진핵 세포체막 또는 미체소체에 존재하는 효소이다. 인간의 FMO 유전자 11개 중 5 개 (FMO1, 2, 3, 4 및 5)는 체내에서 다양한 기관에서 발현되며 여러가지 기능을 발현한다. FMO1-6, 9, 12 및 13은 pseudogene이다. 마우스는 FMO유전자를 9개 (FMO1-6, 9, 12 그리고 13)를 가지고 있으며, 이중 5 개 (FMO1-5)만 발현된다 (Hernandez et al., 2004). 생체의 각종 기관에서 FMO계열의 유전자가 발현되려면 환경 및 식이요법과 같은 다양한 요인에 의해 영향을 받는다. 인간에서 FMO계열의 유전자가 주로 발현되는 기관은 간, 폐 그리고 신장이다. 인간에게서 FMO1은 신장에서 높게 발현되며, 태아의 간, 소장, 폐에서 낮게 발현된다. FMO2는 폐에서 주로 발현되며 신장과 소장, 성인의 간에서는 적게 발현된다. FMO3는 성인 간에서 주로 발현되고, 태아의 간, 신장, 그리고 폐에서는 적게 발현된다. FMO4는 성인 간과 신장에서 높게 발현되고, 태아의 간, 폐 그리고 소장에서는 적게 발현된다. FMO5는 성인의 간에서 높게 발현되고, 태아의 간, 신장 그리고 소장에서는 적게 발현된다 (Zhang et al., 2006). Cytochrome P450 (CYP)계열의 다양한 isozyme은 간에서 다양한 약물을 수용체 형태로 변형시킨 후에 대사를 거쳐서 배설시킨다 (Kim et al., 2015). 이와 유사하게 FMO 계열의 효소도 치료용 의약품, 식이화합물, 살충제 그리고 다른 이질적인 화합물 등에 포함된 N, S, P 등을 포함하는 생체이물질 등을 NADPH-의존성으로 산화시킴으로써 다양한 약물의 해독에 관여한다. 살충제는 다양한 약물의 대사효소의 기질이 되기도 하며, 이들 대사효소의 억제제로 작용하기도 하며, 약물대사효소를 유도하기도 한다. 살충제뿐만 아니라 생체로 유입된 다양한 외래물질 (xenobiotics)은 cytochrome P450-dependent monooxygenase system (P450) 또는 FMO와 같은 다양한 효소에 의해 대사됨으로써 해독된다. FMO는 포유동물 세포의 소포체에 존재하며, 다

양한 xenobiotics를 산화시킨다. Carbendazim (화학명, methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)은 사용 빈도가 높은 농약으로써 분자식이 $C_9H_9N_3O_2$ 이고 분자량이 191.18 Da 인 거의 무색이며 무취의 결정성 분말이다.

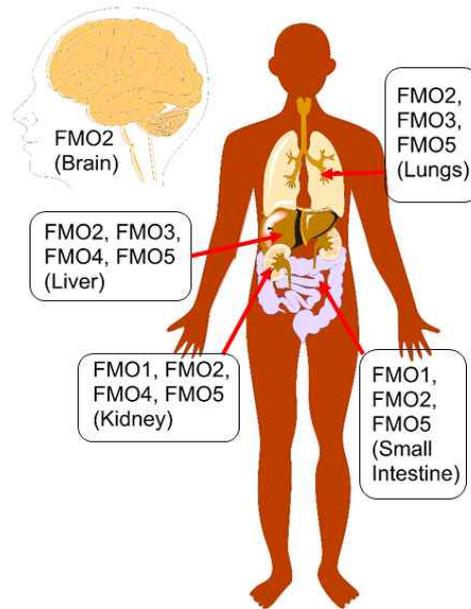


Fig. 2-2. Expression of FMO proteins in various organ in human. Human liver tissue expresses FMO2, FMO3, FMO4 and FMO5.

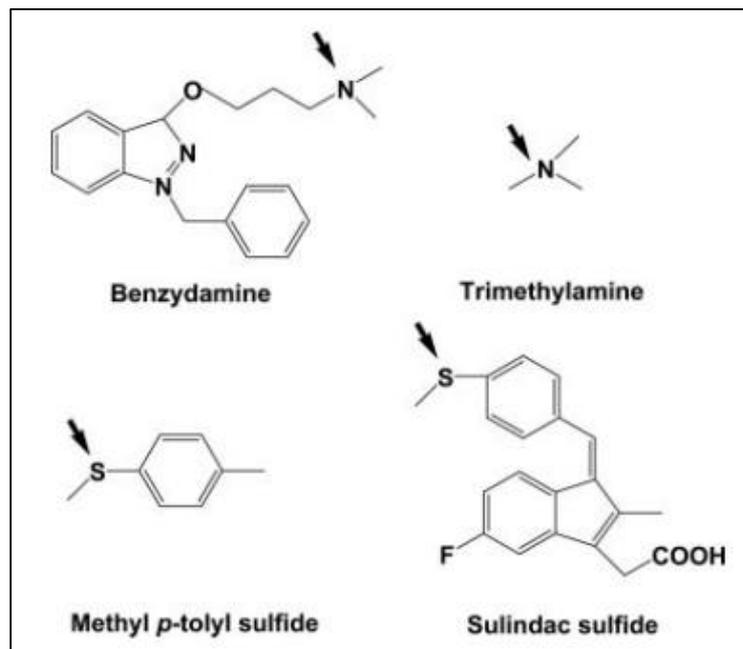


Fig. 2-3. Typical examples of heterocompound that could be metabolized by FMO3 enzyme. Arrow indicates action point by FMO3.

나. FMO 효소에 의한 소변악취물질 분해능

TMA(trimethylamine)은 애완동물, 오리, 가축 등의 배설물 악취의 주요 원인이다. 최근에 급증하는 애완동물의 악취는 아파트 등의 다세대주택에서 민원의 대상이 되고 있다. 또한 민가에서 멀리 떨어진 오리 또는 가축 사육장 일지라도 그 곳에서 발생하는 분뇨에 의한 악취는 도시 전체의 민원을 유발하며 두통, 불면, 분쟁 등의 원인이 되고 있다. 특히 여름철과 야간에까지 진동하는 악취는 수면을 방해하여 많은 사람들의 불편함을 유발하는 실정이다. 본 연구에서는 상황버섯의 베타-글루칸이 FMO3 발현을 촉진함을 세계 최초로 밝혀내었으므로 그 응용 또는 활용방안의 하나로 소변 악취 성분인 TMA를 대사시켜 무악취성분인 TMAO로 변화시키는데 적용할 수 있다. 실제로 일부 환자에서는 FMO3의 발현이 저하되어 악취성분인 TMA가 소변과 피부로 배출되어 생선 썩는 듯한 냄새를 내게 된다. 이를 트리메틸아민뇨증이라고 하며 FMO3의 발현을 촉진시킴으로써 치료할 수 있다 (Fig. 2-4). 상황버섯의 베타-글루칸은 부작용 없이 이러한 환자에게 적용되어 큰 도움을 줄 수 있을 것이다. 트리메틸아민뇨증 환자의 증세는 생선 썩는 냄새가 특징적이지만, 고혈압과 비정상적으로 빠른 심박동(빈맥, tachycardia)과 같은 다른 증상도 나타날 수 있다. 현재 트리메틸아민뇨증은 근본적인 치료약이 없으며, 증세를 완화시키기 위해서는 TMA를 많이 함유한 계란노른자, 콩류, 붉은 살코기, 생선 등의 섭취를 제한하는 것이 좋다고만 알려져 있다.

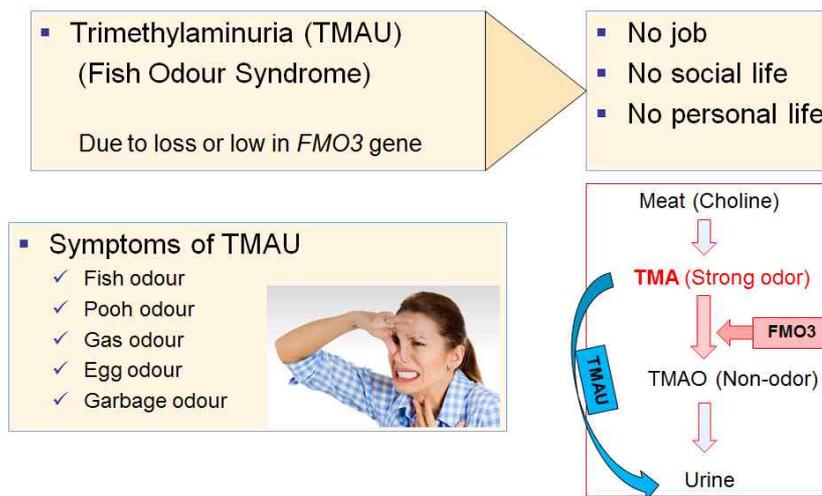


Fig. 2-4. The mechanism of trimethylaminurea (TMAU, fish odor syndrome), due to the loss or low expression of FMO3 in human.

다. FMO의 발현에 의한 체내 니코틴 분해 작용

상황버섯에 의해 증가된 FMO3는 흡연자 체내의 니코틴 분해를 촉진하여 니코틴에 의한 중독 작용을 신속히 제거시켜 줄 수 있다. 상황버섯의 베타-글루칸은 특별한 부작용

용이 없으므로 흡연자에게도 안심하고 적용하여 국민 건강에 이바지 할 수 있다. 또한, 본 연구에서 사용한 바우미 상황버섯은 외국보다 국내에서 대량 재배하고 있으므로 본 연구과제를 통하여 국내산 바우미 상황버섯의 작용을 과학적으로 밝힘과 더불어 응용 범위를 넓힐 수 있으므로 국내산 상황버섯의 소비를 촉진하여 농가 소득을 증대시킬 수 있다. 흡연자에 있어서 니코틴은 흡수된 뒤에 뇌(주사하고 나서 5분 후에 투여량의 8%까지 축적), 신장(투여량의 14% 이상 축적), 위점막, 부신수질, 코 점막 및 침샘에 농축된다. 또한, 체내에 축적된 니코틴은 암 질환, 고혈압, 구강질환 초래, 위산과다분비 촉진에 따른 각종 위장질환과 동맥경화증을 비롯한 각종 순환계 질환을 일으킬 수 있다 (Hanna, 2006). 또한 니코틴은 노화촉진 등에 중요한 요인으로 작용하여 심하면 발작, 경련 및 호흡마비, 근육경련 및 불필요한 혈압상승 등을 유발하므로 상황버섯의 니코틴 분해 작용은 국민 건강에 크게 이바지 할 수 있다. 니코틴은 FMO (flavin-containing monooxygenase)에 의해 니코틴-1-N-옥사이드(nicotine-1-N-oxide)로 되며, 이것의 대부분은 그대로 소변으로 배출되어진다 (Berg et al., 2010).

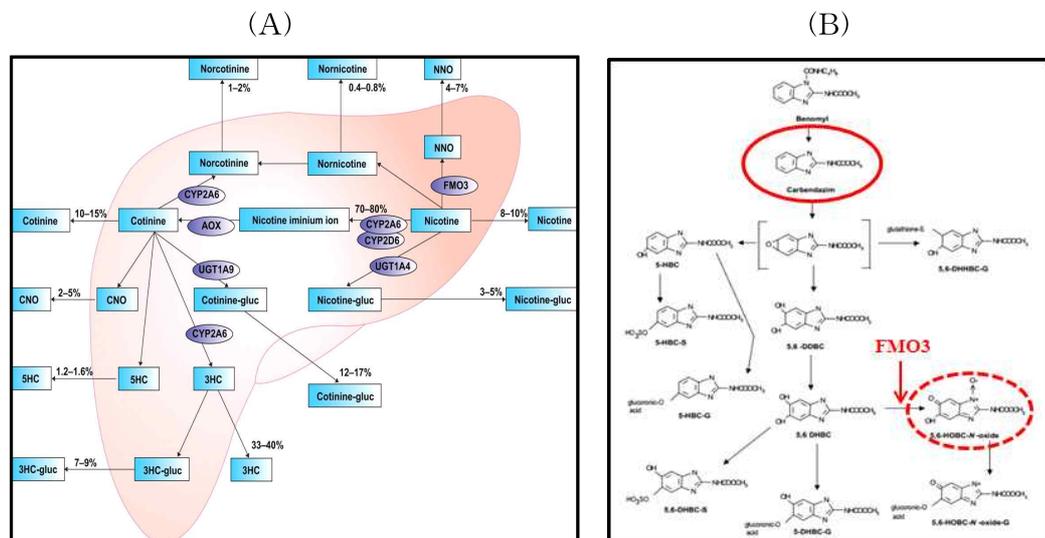


Fig. 2-5. Metabolism of nicotine (A) and carbendazim (B) by FMO3 enzyme, which was increased by the oral administration of beta-glucan from *P. baumii*.

3. Corin 단백질의 작용기전 및 효능 연구동향

가. Corin 단백질의 작용 기전 및 효능

상황버섯의 베타-글루칸을 1주일간 mouse에 경구투여 하였을 경우에 간에서 Corin 단백질의 발현이 5.8배로 크게 증가하였다. 베타-글루칸은 분자량이 크지만 소장 Peyer's patch에 있는 M-cell을 통하여 분해되지 않고 흡수됨이 이미 밝혀지고 있다. 실험동물에서 베타-글루칸을 경구투여 후 3시간 또는 5시간에 최대 흡수되며 이것은

이미 보고된 바가 있다. Corin 단백질의 작용 기전을 살펴보면 transmembrane serine protease인 Corin은 inactive 형태인 pro-ANP를 active 형태인 ANP로 전환시킨다. 활성화된 ANP는 신장 및 말초 혈관과 같은 표적 기관에서 수용체인 NPR-A에 결합하여 세포내 GTP를 cGMP로 전환시켜 Na^+ 의 배설 촉진, Na^+ 의 재흡수 억제 및 혈관 확장 작용을 나타낸다 (Zhoua and Wu, 2013) (Fig. 2-6).

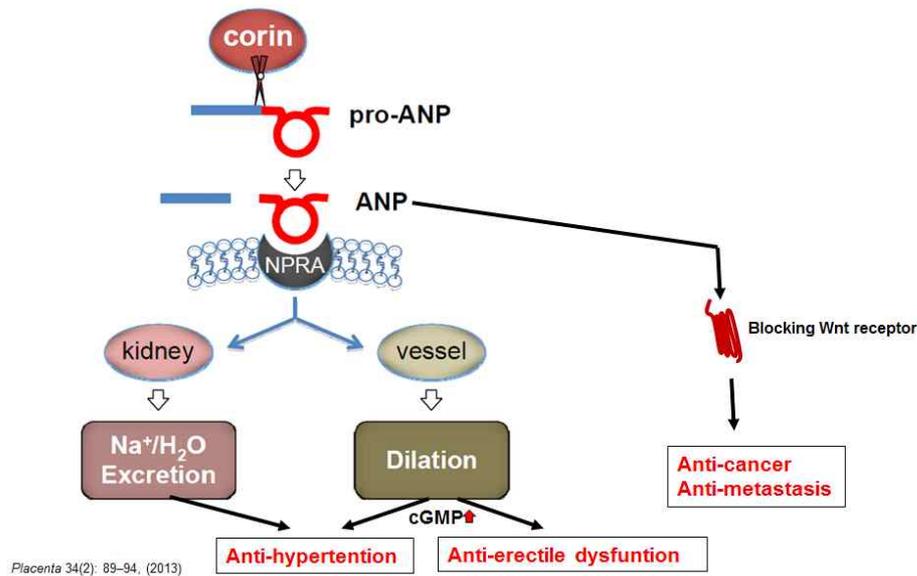


Fig. 2-6. Biological functions of ANP which was produced by the action of corin membrane enzyme on pro-ANP. The produced ANP exerts various functions by binding to NPRA or Wnt receptor.

Corin에 의해서 활성화된 ANP는 위와 같은 작용을 통해 염 배설을 촉진하고 이뇨작용을 증가시킨다. 또한 혈액량을 감소시키고 혈관 장력을 수용체 의존적 방식으로 이완시켜서 고혈압을 낮추는 심장 호르몬이다 (Bouley, 2012) (Fig. 2-7). 심장에서 Corin 유전자는 정상 혈압유지와 심장기능 유지에 있어서 필수적인 요소로서 작용한다 (Li et al., 2017). 심장질환 뿐만 아니라 자궁의 spiral artery remodeling을 촉진시켜 수정란의 착상을 촉진시키는 작용까지 가지고 있다 ((Kaitu'u-Lino et al., 2013)). 지금까지 상황버섯의 베타-글루칸은 혈압 저하 작용을 나타내는 것은 알려져 있었지만, 그 작용 기전은 밝혀내지 못하고 있는 실정이다. 상황버섯이 허혈-재관류의 손상을 감소시켜준다는 보고는 알려져 왔다 (Su et al., 2017). 본 과제에서 상황버섯의 베타-글루칸이 Corin 단백질을 발현시킨다는 것을 최초로 밝혀내었을 뿐만 아니라 체내 나트륨 이온의 배설을 촉진함을 세계 최초로 밝혀내어 베타-글루칸의 혈압 저하 작용 기전을 최초로 증명할 수 있게 되었다.

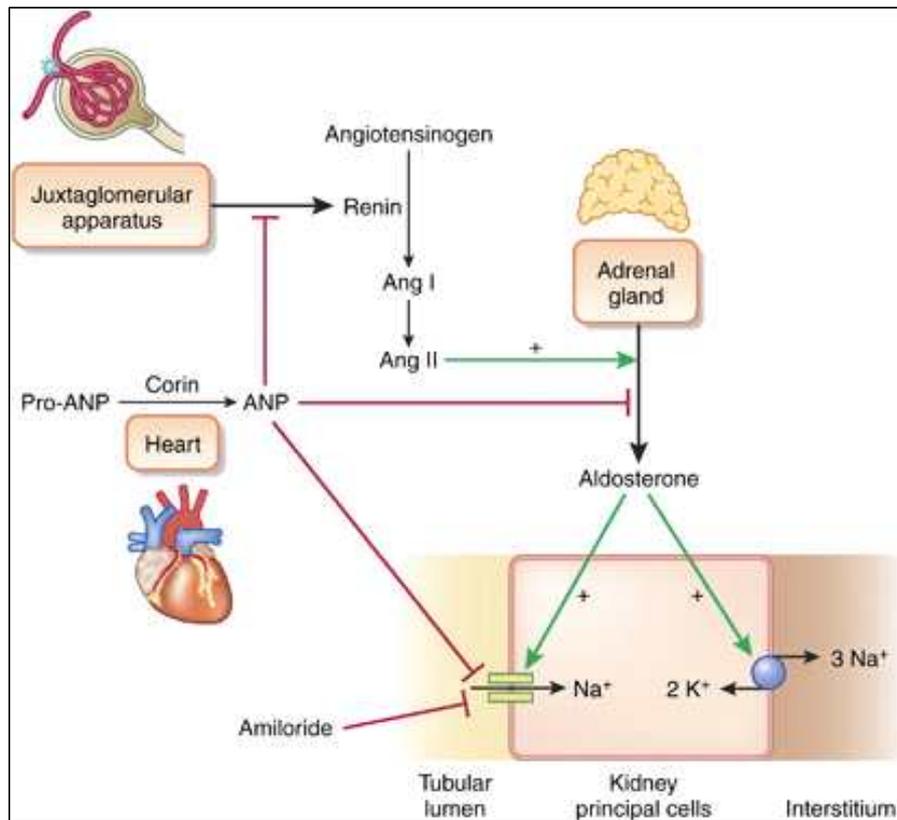


Fig. 2-7. Mechanism of reduction of blood pressure and heart attack by ANP which was produced by the action of corin in heart.

4. Metallothionein (MT) 단백질의 효능에 대한 연구동향

가. 체내 중금속의 조절 및 제거

본 연구진은 선행연구를 통해 상황버섯의 베타-글루칸을 mouse에 일주일간 경구 투여 하였을 경우에 MT1(metallothionein 1)은 4.6배, MT2(metallothionein 2)는 11.3배 증가한 것을 metabolomics를 통해 확인하였다. MT는 시스테인을 많이 포함한 금속 결합 저분자단백질로서 인간세포에서 18종 정도의 기능적 아형(isoform)을 가지고 있는 것이 알려져 있다 (Thirumorthy et al., 2011). MT는 정상적인 생리 기능을 유지하는데 꼭 필요한 필수중금속인 아연, 철, 구리와 결합하여 체내 필수중금속의 항상성을 유지시켜 준다. 구리는 MT 효소의 작용에 필수적이다 (Ogórek, et al., 2017). 또한 Cadmium, arsenic 등과 같은 외래 유해중금속과 결합하여 체내에서 제거한다. 체내에 중금속이 쌓이면 아토피나 두통, 집중력 저하, 무기력증, 탈모, 만성피로가 유발되며 심각하게는 자폐증도 유발될 수 있다 (Saghazadeh and Rezaei, 2017). 따라서 상황버섯의 베타-글루칸은 체내의 유해 중금속을 제거하여 상기와 같은 다양한 증상을 완화시킬 수 있다. 본 연구과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸이 유해 중금속을 제거할 수 있다는 것을 최초로 밝혀내었다.

나. 외부 작용으로 인한 metallothionein (MT)의 발현과 작용

MT는 스트레스에 대항하는 단백질로 중금속 뿐만 아니라 호르몬, 인터페론, 자외선, 이온화 방사선 및 활성산소종에 의해서 유도될 수 있다. MT의 시스테인 잔기는 수퍼 옥사이드나 하이드록실 라디칼 등 프리라디칼을 포획한다. 이 반응으로 시스테인이 산화되어 시스틴이 됨으로서 시스테인과 결합한 금속 이온이 방출된다. 방출된 아연은 더 많은 MT 생성을 활성화시켜 산화 스트레스를 억제시킨다.

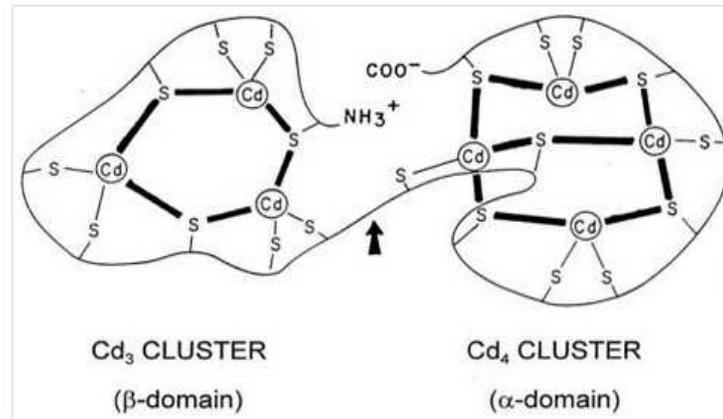


Fig. 2-8. Mechanism of excretion of Cd heavy metal by metallothionein (MT). Oral administration of beta-glucan of *Phellinus baumii* induced MT expression in mouse liver tissue, which accelerated excretion of Cd or Pb in mouse.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에 차지하는 위치

1. FMO 유전자발현

본 연구에서는 FMO 유전자의 발현이 *P. baumii* 자실체의 열수 추출물 (PBE) 또는 PBG 분획의 경구 투여에 의해 증가됨을 발견하였다. 경구 투여 된 PBE는 생쥐에서 carbendazim 신진 대사를 촉진시켰다. 본 연구진은 금번과제에서 *P. baumii*의 추출물을 동물에 경구투여하여 간조직에서 FMO 유전자가 발현됨을 세계최초로 밝혔다.

2. Corin 단백질 발현유도

지금까지 상황버섯의 베타-글루칸은 혈압 저하 작용을 나타내는 것은 알려져 있었지만, 그 작용 기전은 밝혀내지 못하고 있는 실정이다. 본 과제에서 상황버섯의 베타-글루칸이 Corin 단백질을 발현시킨다는 것을 최초로 밝혀내었을 뿐만 아니라 체내 나트륨 이온의 배설을 촉진함을 세계 최초로 밝혀내어 베타-글루칸의 혈압 저하 작용 기전을 최초로 증명할 수 있게 되었다. 본 과제에서 베타-글루칸에 의하여 증가된 corin에 의하여 ANP 생

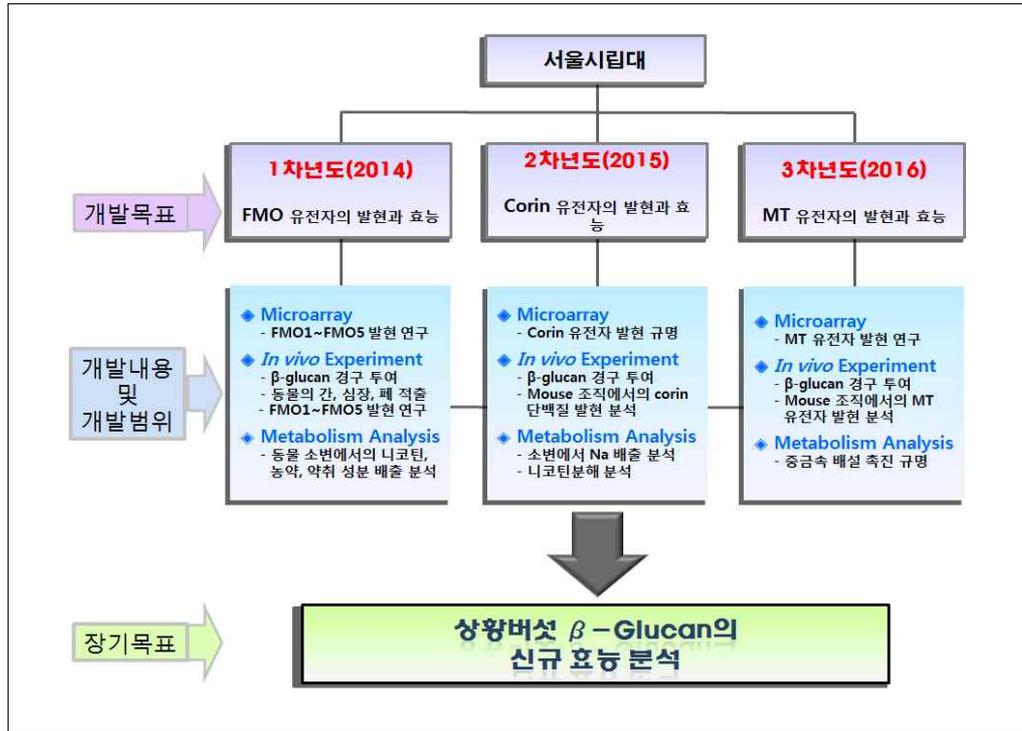
성이 증가하여 Wnt receptor에 경쟁적으로 결합함으로써 항암작용을 나타낼 수 있으므로 베타-글루칸에 의하여 Wnt receptor에 결합하여 항암작용을 나타냄을 세계 최초로 밝히게 되었다.

3. Metallothionein (MT) 유전자의 발현유도

상황버섯의 베타-글루칸은 체내의 유해 중금속을 제거하여 다양한 부작용을 완화시킬 수 있다. 본 연구과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸이 납(Pb)과 카드뮴(Cd) 등의 유해 중금속을 제거할 수 있다는 것을 최초로 밝혀내었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

년차별 연구체계도



Scheme 1. Annual plan of the project on the functions of FMOs, corin and metallothionein which were induced by the oral injection of beta-glucan from *Phellinus baumii* in mice.

제 1 절 FMO 유전자의 발현과 효능

1. 실험적 접근방법

가. *P. baumii*의 분획

본 실험을 위하여 금산균주보관소(금산균, 한국)으로부터 배양 균주를 얻어 *Phellinus baumii* pilat의 자실체를 얻었다. *P. baumii*의 자실체의 건조 분말을 10 배 용량의 증류수를 사용하여 100℃에서 10시간동안 추출하였다. Fig. 1에서 보이는 바와 같이, PBE, PBW 및 PBG는 *P. baumii*의 자실체로부터 분획으로 나누었다. FMO subclass의 효소 유도를 위해 PBR, PBW 및 PBG를 ICR 수컷 마우스에 20 또는 100 mg/kg (n=3, 그룹당)의 농도로 하루 1회, 총 7일동안 경구투여하였다. 시료 분획을 경구투여하기 위

하여 시료를 증류수에 용해하여 마우스당 0.25 ml의 용량으로 각 마우스에 경구투하였다 (Fig. 3-1).

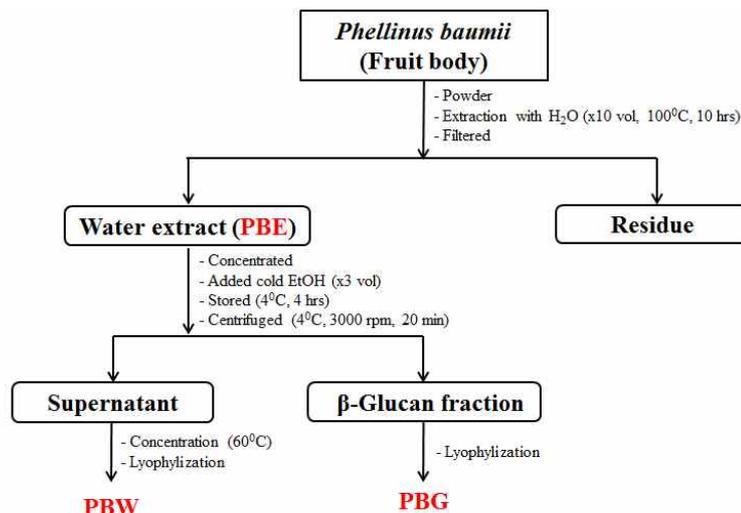


Fig. 3-1. Fractionation of PBE, PBW and PBG from carpophores of *P. baumii*.

나. Microarray 분석

PBE를 ICR 수컷 마우스에 1일 또는 7일동안 경구투여한 후, 마우스를 dichloromethane증기를 사용하여 안락사시켰다. microarray 분석을 위하여 간조직에서 총 mRNA를 추출하였다. 간에서 total RNA 추출물을 얻기 위해, 150 mg의 간 조직을 1.5 ml의 RNA 안정화시약(Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 처리하여 유전자 발현 프로파일을 보존했다. 대조군 및 PBE처리한 실험군으로부터 얻은 total RNA를 Mouse Gene 1.0 ST array (Affymetrix Inc., CA, USA)를 사용하여 분석하였다 (Fig. 3-2).

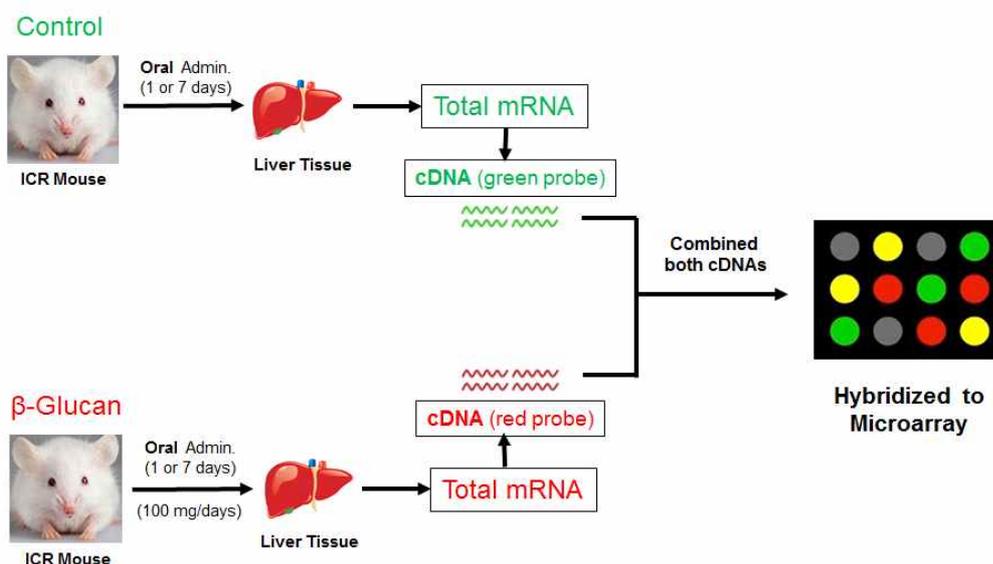


Fig. 3-2. Procedure for microarray analysis in mouse liver tissue that was treated

with beta-glucan fraction of *P. baumii*.

다. Carbendazim (Xenobiotics)의 경구 투여

FMO subclass에 의한 살충제 제거에 대한 PBE의 효과를 평가하기 위하여 ICR 수컷 마우스에 PBE를 1일 1회 20 또는 100 mg/kg의 농도로 경구투여하였다. 8 일째에, 올리브유에 있는 카벤다짐(carbendazim) 500 mg/kg을 마우스에게 경구 투여하였다. 혈청중의 카벤다짐 제거 정도를 분석하기 위해, 카벤다짐이 투여된지 0.5, 1, 1.5, 2, 6, 12시간이 지난 후 안락사시킨 마우스의 심장에서부터 혈액을 얻었다. 대조군에는 500 mg/kg의 carbendazim만 투여하였고 PBE는 투여하지 않았다 (Fig. 3-3).

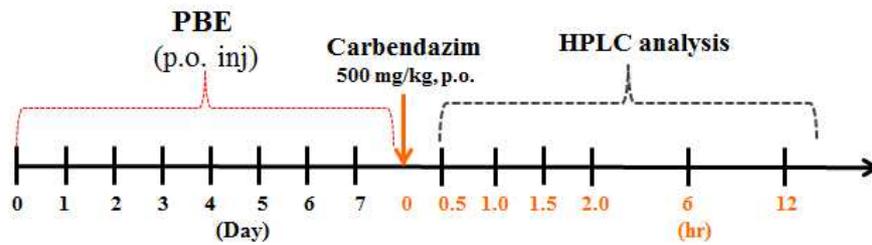


Fig. 3-3. Protocol for the clearance of xenobiotic in mouse that was treated with beta-glucan of *P. baumii*.

라. cDNA의 합성

PBE, PBW 및 PBG에 의한 FMO subclass 유전자 발현 유도를 분석하기 위하여 total RNA를 다음과 같이 추출하였다. 냉동시킨 간, 폐 및 신장 조직 (0.1 g)에 1 ml TRIzol 시약을 첨가하고 혼합물을 균질화시켰다. Chloroform을 첨가함으로써 RNA 함유 aqueous phase를 얻고, isopropyl alcohol로 RNA를 침전시킨다. 얻어진 RNA pellet을 75 % 에탄올로 세척하고 RNase가 없는 증류수 50 μ l에 용해시켰다. Moloney murine leukemia virus (M-MLV) 역전사효소 (Promega, USA)를 이용하여 cDNA의 첫번째 가닥 합성을 수행하였다. M-MLV 역전사 효소(M-MLV RT)는 긴mRNA 주형으로부터 cDNA 합성에 사용될 수 있는 RNA 의존성DNA 중합 효소이다. 5 μ g의 RNA, 1 μ l의 oligo (dT) (0.5 μ g/ μ l)와 4 μ l의 DEPC 처리된 증류수의 혼합물을 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하고 5분 이상 얼음에 두었다. 4 μ l의 5 x reaction buffer, 2 μ l의 10 mM dNTP 혼합물, 2.4 μ l ddH₂O 및 0.1 μ l RNase inhibitor를 첨가하여 최종반응 혼합물을 제조하였다. 반응물을 42 $^{\circ}$ C에서 3 분간 배양하고, 1 μ l의 M-MLV 역전사 효소를 첨가한 이후 42 $^{\circ}$ C에서 60 분간 추가 배양하였다. cDNA 합성은 70 $^{\circ}$ C에서 5 분 동안 가열함으로써 종결하였다. 물질은 PCR을 이용하여 즉시 증폭하거나 사용전까지 -20 $^{\circ}$ C에 저장하였다.

마. FMO subclass 유전자의 PCR 분석

마우스 간, 폐 및 신장에서 FMO 유전자 발현을 분석하기 위해, PCR 증폭은 cDNA와 FMO1, FMO2, FMO3, FMO4 및 FMO5에 특이적인 프라이머를 함유하는 튜브에 Taq polymerase를 첨가하였다 (Table 3-1). 증폭은 95°C에서 2 분간 가열 (initial denaturation)한 이후 30 초간 95°C (denaturation), 30 초간 55°C (annealing), 1 분간 72°C (elongation), 5 분간 final elongation을 30회 시행하였다. PCR 생성물은 1% 아가 로즈겔 전기영동으로 분석하였다.

Table 3-1. Primers used for PCR of mouse FMO genes.

Gene (Tissue used)	PCR product (bp)	Direction	Primer sequence (5' →3')
FMO1 (Kidney)	217	F	CAT TCC AAC TAC AAG GAC TCG
FMO1 (Kidney)	217	R	TGT CTC TGG ACA GTG GGA AGT
FMO2 (Lung)	382	F	CCG GGT CTT TAA GGG TTT CAG G
FMO2 (Lung)	382	R	AGG CTC CAT CTT CCC AAC CGT A
FMO3 (Liver)	102	F	CAG CAT TTA CCA ATC GGT CTT C
FMO3 (Liver)	102	R	TTG CTG TGA TGC ATG AAG TTG
FMO4 (Kidney)	144	F	TCC TGA GCC CAC ATT TAC CTC
FMO4 (Kidney)	144	R	CCA GTG TTT CCA AGA CCA ACC
FMO5 (Liver)	235	F	GCT TGC CTA CAC GGT TCA AG
FMO5 (Liver)	235	R	ATC ACA CGG ATG CTC ACC TG
GAPDH	302	F	AGC CTC GTC CCG TAG ACA AA
GAPDH	302	R	CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC

바. 혈중 카벤다짐의 배설 실험

ICR 마우스에 PBE를 0, 20, 100 mg/kg으로 경구투여한 지 7 일이 지난 후 8 일째에 카벤다짐 500 mg/kg을 경구투여하였다. 혈청 카벤다짐 농도는 카벤다짐 투여 후 0.5, 1.0, 2, 6, 12 시간 후에 분석하였다. 혈청 카벤다짐 농도의 HPLC분석을 위해, 30분 동안 흔들어주면서 0.6 ml 에틸아세테이트(EtOAc)를 사용하여 0.45 ml 혈청에서 unmetabolized carbendazim을 추출하였다. 이어서, 혼합물을 15 분 동안 원심분리하고, EtOAc층을 에펜도르프 튜브에 모았다. HPLC분석을 위해, 0.1 ml의 EtOAc층을 실온에서 6시간동안 건조시킨 다음 HPLC분석을 위해 0.1 ml의 메탄올에 용해시켰다 (Fig. 3-4). Carbendazim (methyl 2 benzimidazole carbamate, C₉H₉N₃O₂, FW 191.19), acetonitrile, methanol 및 HPLC용액은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다. HPLC분석을 위한 carbendazim (1 mg/ml)의 저장용액을 메탄올에서 제조하였다. 저장용액은 사

용하기 전까지 4°C에 보관하였다. Calibration을 위한 카벤다짐의 표준용액은 원액을 메탄올로 희석하여 1, 10, 100 및 1,000 µg/ml이 되도록 만들었다. 245 nm에서 UV검출기 (Shodex RI 71, Dionex, Germany)를 사용한 HPLC (Dionex, Germany)로 혈청 카벤다짐을 분석하였다. HPLC분석 조건은 다음과 같다: 이동상은 MeOH:물 (1 : 1) 비율이고, flow rate은 1 ml/min이고, 주입 부피는 20 µl이다. 기기 검출 파장 및 컬럼은 각각 245nm 및 HPLC Luna column 5µ C18 (2) 100 Å (250.4 mm, Phenomenex, USA)이었다.

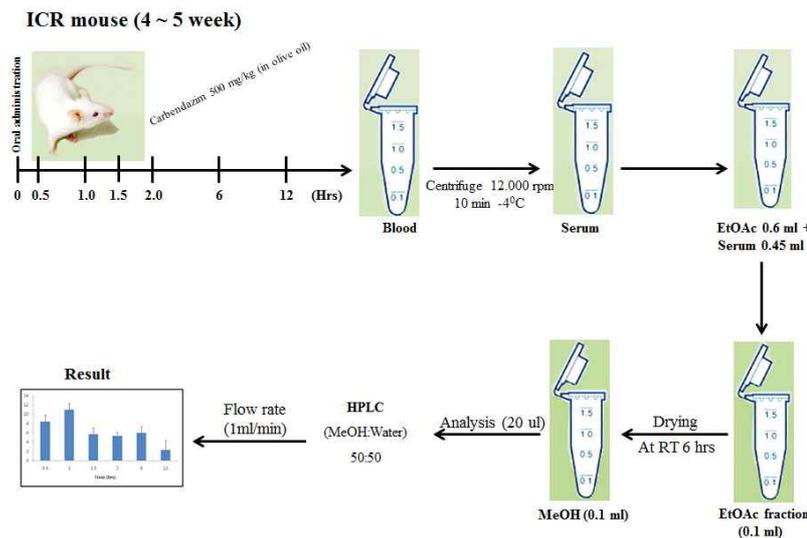


Fig. 3-4. Determination of residual carbendazim of the mouse serum that was treated with carbendazim in the absence or presence of beta-glucan treatment.

사. SPME-GC/MS를 이용한 소변중 TMA양 확인

24시간 채취한 소변에 3차증류수를 더하여 15 ml로 동일하게 맞추어 하루동안 배출한 TMA의 양을 측정할 수 있도록한 뒤에 소변 sample 중 2 ml을 4-ml vial with a polypropylene screwed cap and a PTFE/silicone septum (Supelco, USA)에 넣어 마개를 닫은뒤 SPME fiber(75 µm carboxen/polydimethylsiloxane Stable Flex™, Supelco, USA)를 마개에 꽂아 80 °C에서 10분간 extraction을 진행하였다. Extraction 이후 물질이 흡착된 fiber를 이용 Agilent 6890N gas chromatography instrument (Agilent, USA)를 이용하여 GC/MS를 5% phenyl dimethylpolysiloxane fused-silica capillary column (DB-5MS 30 m × 250 µm i.d., film thickness 0.25 µm, J&W Scientific, USA)를 이용하여 진행하였다. GC/MS 분석조건은 컬럼온도 40°C에서 2분이후 20°C/min씩 올려 320°C까지되게하여 총 20분간 진행하였고 주입구온도는 250°C, 검출기온도는 300°C로 하였다. 캐리어가스는 He을 1 ml/min으로 이용하였다. 이온화는 70eV 에

너지로 EI 230°C에서 진행하여 m/z 58, 42로 trimethylamine을 검출하였다. Standard curve를 농도를 달리하면서 측정하여 농도에 따른 area를 계산하여 standard curve를 그린후 공식을 구하여 sample에 대해GC/MS를 수행하여 TMA의 농도를 구하였다.

아. Headspace GC를 이용한 소변중 TMA양 확인

24시간 채취한 소변에 3차증류수를 더하여 15 ml로 동일하게 맞추어 하루동안 배출한 TMA의 양을 측정할 수 있도록한 뒤에 한시간동안 상온에 두어 안정화시킨 소변 sample 중 2 ml을 4 ml screw top vial (Agilent, USA)에 넣고 10 M NaOH 1 ml을 더해 pre-drilled LB-2 septa (Thermogreen, USA)으로 마개를 닫아 80°C에서 20 분간 두어 extraction 및 equilibration을 진행하였다. 그 이후 gas syringe (1750RN 500 μ l SYR (Hamilton, USA)을 마개에 꽂아headspace 상에서 500 μ l의 gas를 추출하여 ACME 6100 gas chromatography instrument (영린기기, Korea)에서 GC 분석을 a FactorFour™; Capillary Column (VF-5MS, 30 m, 0.25 mm 0.25 μ m, Agilent, USA)을 이용하여 수행하였다. GC 분석조건은 컬럼온도 40°C에서 10분 이후 10°C/min씩 올려 150°C까지 되게하여 총 25분간 진행하였고 주입구온도는 250°C, 검출기온도는 280°C로 하였다. Standard curve를 농도를 달리하면서 측정하여 농도에 따른 area를 구해 standard curve를 그린후 공식을 구하여 sample에 대해 GC를 수행하여 TMA의 농도를 구하였다.

자. 통계 분석

모든 정량측정은 적어도 3회 실시하였고 평균 \pm SEM 값을 제시하였다. 평균값의 그룹간 비교는 InStat 3.06 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 one-way ANOVA에 의해 수행하였다. p 값이 ≤ 0.05 인 경우 통계적 유의성을 나타내는 것으로 하였다.

2. 연구결과

가. 마우스 간에서 유전자 발현에 대한 microarray Analysis

Microarray분석은 PBE 경구투여한 마우스의 간에서 얻은 total mRNA를 사용하였다. 마우스는 7 일 연속으로 100 mg/kg의 PBE를 일회 또는 수회 경구투여하였다. microarray분석은 PBE의 단일 경구투여 (SOA)에 의해 8 개 및 3 개의 유전자가 각각 세배 이상 증가 및 감소되었다. 대조적으로, PBE의 다중경구투여에 의해 23개 및 11개의 유전자가 각각 증가 및 감소하였다 (Table 3-2).

Table 3-2. Microarray analysis of mouse liver tissue following single and multiple oral administrations of 100 mg/kg PBE.

Oral Administration	Cutoff (Fold change)	Liver Gene Expression	No. of Modulated Gene*	
			SOA	MOA
Control vs 100 mg/kg PBE	1.3	UP	1184	1358
		DOWN	1264	1153
	1.5	UP	328	368
		DOWN	292	304
	2	UP	45	87
		DOWN	61	51
	3	UP	8	23
		DOWN	3	11

*For the microarray analysis, total mRNA was extracted from the liver of ICR male mice with/without single or multiple oral administrations of 100 mg/kg PBE. SOA: single oral administration, MOA: multiple oral administrations over 7 days.

FMO3, BC014805, Slc34a2, Ar, Cdkn1a, BC023105, Smord14d 그리고 Abcd2의 8 개 유전자가 SOA에 의해 3 배 이상 증가되었다. SOA에 의해 발현이 변화된 8 개 유전자의 증가된 평균 fold-change 값은 5.1, 4.7, 4.3, 3.9, 3.6, 3.5, 3.4 및 3.2이었다. 다중경구투여 (MOA)에서 그 값은 각각 17.6, 0.4, 0.5, 1.1, 0.6, 1.8, 2.5 및 1.0이었다. 8 개의 증가된 유전자 중 FMO3 (flavin-containing monooxygenase 3)는 투여 횟수에 비례하여 증가하였다. SOA 및 MOA 발현은 대조군에 비해 각각 5.1 배 및 17.6 배 증가되었다. 따라서 추가 분석을 위해 선택된 FMO subclass 유전자를 처리했다. PBE의 SOA에 의해, 3개의 유전자 (Mela, Ces2a 및 Snord116)가 감소되었다. 세 가지 감소된 유전자의 평균 fold-change는 각각 0.1, 0.3 및 0.3이었다. MOA에서 평균 fold-change는 각각 1.3, 2.8 및 0.7이었다.

PBE의 MOA는 마우스 간에서 Fmo3, Mt2, Cyp45a1, Corin, Mt1, kr1e1, Plk3, Fmo2, Dpy1913, Cm3, Cyp2a4, Cm13, Gm14403, Nipal1, Per1, Cyp2a5, Gm4956, Slc16a5, Fmo4, Cxcl10, Cux2 및 1810046k07rik의 23개 유전자가 증가되었다. 23 개의 증가된 유전자의 평균 fold-change 값은 각각 17.6, 11.3, 8.8, 5.8, 4.6, 4.2, 3.8, 3.8, 3.7, 3.2, 3.6, 3.2, 3.6, 3.5, 3.5, 3.4, 3.2, 3.2, 3.2, 3.1, 3.1, 3.1 및 3.0이다. SOA에 의해 유도된 fold change는 5.1, 0.9, 1.9, 0.4, 1.0, 0.7, 0.6, 1.5, 0.6, 2.1, 1.6, 2.1, 1.5, 1.1, 1.1, 1.5, 1.1, 2.1, 1.4, 1.3, 1.1, 1.4 및 0.6이었다 (Tab. 3-3). 흥미롭게도, 23 개의 유전자 중 FMO2, FMO3 및 FMO4는 SOA와 MOA 둘 모두에 의해 지속적으로 증가되었다. 따라서 우리는 FMO1, FMO2, FMO3, FMO4 및 FMO5의 발현을 분석하였다. PBE의 MOA는 마우스 간의 간에서 11 개의 유전자 (Gdpd3, Ildr2, Cfhr1, Gabra3, Gm6644, Gm6614, Akr1b3, Bcl6, Trem14, Creld2 및 Dio1)가 감소하였다. 이 11개 유전자의 발현의 평균 fold-change는 각각 0.1, 0.1, 0.2, 0.2, 0.3, 0.3, 0.3, 0.3, 0.3, 0.3 및 0.3이었다. SOA에 의

한 발현의 평균fold-change는 각각 1.1, 1.0, 0.8, 0.8, 0.3, 1.4, 0.3, 0.5, 0.7, 2.4 및 1.6이었다 (Tab. 3-4). 따라서 FMO2, FMO3, FMO4 발현은 PBE의 SOA와 MOA에 의해 지속적으로 증가하였다. FMO 유전자는 xenobiotics의 대사나 내부에서 발생하는 악취 대사물에 관여하여 배설을 촉진시킨다. 마우스 간에서의 발현이 PBE 처리에 영향을 받는 유전자들 중에서 약물대사효소를 코딩하는 두개의 유전자가 증가되었고, 한 개는 SOA에 의해 감소되었다. FMO3 및 Cyp2b9는 각각 5.1 배 및 2.6 배의 증가하였다. 대조적으로, Gsta1은 0.5 배 감소되었다 (데이터 생략). FMO3의 주요기능 중 하나는 xenobiotics를 대사하는 것이다. 항암제인 Tamoxifen은FMO3에 의해 대사된다. 그러므로 PBE 또는 *P. baumii*의 섭취가 혈청에서 Tamoxifen의 제거를 촉진시킬 수 있다.

대조적으로, MOA는 마우스 간에서 7가지 약물대사 유전자 (FMO2, FMO3, FMO4, Gstt1, Cyp2b13, Cyp2a4 및 Cyp2a5)의 발현을 유도하였다. 이들 유전자 발현의 fold-change는 각각 3.8, 17.6, 3.1, 2.3, 2.5, 3.6 및 3.4였다. PBE의 MOA는 SOA보다 FMO2, FMO3 및 FMO4 발현에서 더 큰 fold-change를 나타냈다.

SOA와 MOA에 의한F MO subclass 유전자의 발현변화를 비교하였다. FMO1 및 FMO5 발현은 PBE의 SOA 및 MOA에 의해 영향을 받지 않았다. FMO2와 FMO4 발현은 PBE의 SOA에 의해 유도되지 않았다. 그러나 이들의 발현은 PBE MOA에 의해 각각 3.8배 및 3.1배 증가했다. FMO subclass 중 FMO3 발현은 SOA와 MOA에 의해 각각 5.1배와 17.6배로 증가되었다 (Tab. 3-5). 따라서, 100 mg/kg PBE 일회 처리로는 FMO3만이 강력하게 발현이 유도되었다. FMO1과 FMO5는 큰 변화가 없으며 FMO2와 FMO3, FMO4에서는 유전자 증가를 확인 할 수 있었다.

Table 3-3. Genes upregulated by over threefold in mouse liver as determined by microarray analysis after multiple oral administrations of 100 mg/kg/day PBE.

No	Gene Symbol	Biological Function	Average Fold Change*	
			SOA	MOA
1	FMO3	• Drug metabolic process	5.1	17
2	MT2	• Cellular zinc ion homeostasis • Detoxification of copper ion	0.9	11
3	CYP46A1	• Lipid, steroid and cholesterol metabolic process	1.9	8
4	CORIN	• Peptide hormone processing • Neuron differentiation	0.4	5
5	MT1	• Cellular metal and zinc ion homeostasis • Nitric oxide mediated signal transduction • Detoxification of copper ion	1.0	4
6	AKR1E1	• Oxidation-reduction process	0.7	4
7	PLK3	• Protein phosphorylation, signal transduction	0.6	3
8	FMO2	• Organic acid metabolic process • NADP metabolic process • Xenobiotic, toxin and drug metabolic process	1.5	3
9	DPY19L3	• Biological process	0.6	3
10	CML3	• Negative regulation of cell adhesion	2.1	3
11	CYP2A4	• Steroid and drug catabolic process • Oxidation-reduction process	1.6	3
12	CML3	• Negative regulation of cell adhesion	2.1	3
13	GM14403	• Biological process	1.5	3
14	NIPAL1	• Ion transport, magnesium ion transport	1.1	3
15	PER1	• Regulation of transcription • Circadian rhythm	1.1	3
16	CYP2A5	• Oxidation-reduction process	1.5	3
17	GM4956	• Unknown	1.1	3
18	CML3	• Negative regulation of cell adhesion	2.1	3
19	SLC16A5	• Biological process	1.4	3
20	FMO4	• Oxidation-reduction process	1.3	3
21	CXCL10	• Defense response to virus • Inflammatory response, immune response	1.1	3
22	CUX2	• DNA-dependent, regulation of transcription	1.4	3
23	1810046K07RIK	• Biological process	0.6	3

*SOA: single oral administration of 100 mg/kg PBE,

MOA: multiple oral administrations of 100 mg/kg PBE for 7 days.

Table 3-4. Genes downregulated by over threefold in mouse liver as determined by microarray analysis after multiple oral administrations of 100 mg/kg/day PBE.

No	Gene Symbol	Biological process	Average Fold Change*	
			SOA	MOA
1	GDPD3	• Glycerol metabolic process, lipid metabolic process	1.1	0.1
2	ILDR2	• Response to glucose stimulus • Insulin secretion • Pancreas development • Homeostasis of number of cells within a tissue	1.0	0.1
3	CFHR1	• Biological process	0.8	0.2
4	GABRA3	• Ion and chloride transport • Gamma-aminobutyric acid signaling pathway • Synaptic transmission	0.8	0.2
5	GM6644	• Sorbitol biosynthetic process • Steroid metabolic process • S-activated protein kinase signaling cascade	0.3	0.3
6	GM6614	• Drug transmembrane transport, drug transport methotrexate transport	1.4	0.3
7	AKR1B3	• Sorbitol biosynthetic process • Steroid metabolic process • Stress-activated protein kinase signaling cascade oxidation-reduction process	0.3	0.3
8	BCL6	• Protein import into nucleus • Translocation, cell morphogenesis • Negative regulation of type 2 immune response transcription • Rho protein signal transduction, spermatogenesis, protein localization, • B cell differentiation, negative regulation of cell growth	0.5	0.3
9	TREML4	• Signal transduction	0.7	0.3
10	CRELD2	• B process	2.4	0.3
11	DIO1	• Metabolic process • Hormone biosynthetic process • Oxidation-reduction process	1.6	0.3

*SOA: single oral administration of 100 mg/kg PBE,

MOA: multiple oral administration of 100 mg/kg PBE over 7 days,

Table 3-5. Fold-changes in the expression of FMO subclass genes in mouse liver as determined by microarray analysis after single or multiple oral administrations of PBE to ICR mice.

FMO family	Fold-increase by PBE	
	SOA (1 day)	MOA (7 days)
FMO1	NC	NC
FMO2	1.5	3.8
FMO3	5.1	17.6
FMO4	1.3	3.1
FMO5	NC	NC

*SOA: single oral administration of 100 mg/kg PBE,

MOA: multiple oral administration of 100 mg/kg PBE over 7 days,

NC: no change

나. 마우스의 신장, 폐, 간에서 FMO의 발현

microarray FMO 유전자 발현 데이터를 검증하기 위해, PCR에 의해 FMO subclass 유전자의 발현 유도를 확인하였다. 마우스에게 PBE, PBW 또는 PBG를 7일 동안 경구투여하고 마우스 간, 폐 및 신장에서 FMO subclass 유전자의 발현을 조사하였다. FMO4 발현은 PBE와 PBG의 MOA에 의해 현저하게 증가하였다. 그러나, 신장 FMO1 발현은 PBE, PBW 또는 PBG 처리에 의해 변화하지 않았다 (Fig. 3-5). PCR에 의해 결정된 PBE 투여로 인한 신장 FMO4 발현의 상향조절은 microarray 분석에서 검출된 3.1배 증가와 일치한다. 다음으로 PBE, PBW 및 PBG의 MOA 후 마우스 폐 조직에서 FMO2의 PCR 분석을 수행했다. PBE 및 PBG는 FMO2 발현의 현저한 증가를 일으켰다. 특히, PBG는 FMO2 발현을 강하게 유도했다. PBW는 FMO2 발현을 약하게 유도하였다 (Fig. 3-6).

다음으로 경구 처리 후 간 조직에서 PCR FMO3과 FMO5 발현을 조사했다. 100 mg/kg의 PBE는 마우스 간에서 FMO3 발현을 약하게 유도하였다. 그러나 PBG는 20 mg/kg에서 FMO3 발현을 증가시키기 시작했다. 100 mg/kg의 PBG는 20 mg/kg의 PBG보다 FMO3 발현의 유도를 더 강하게 나타냈다. 그러나, FMO5 발현은 PBE, PBW 또는 PBG 처리에 의해 유도되지 않았다 (Fig. 3-7). 결론적으로 PBG는 폐, 간 및 신장에서 각각 농도 의존적으로 FMO2, FMO3 및 FMO4 발현을 유도하였다.

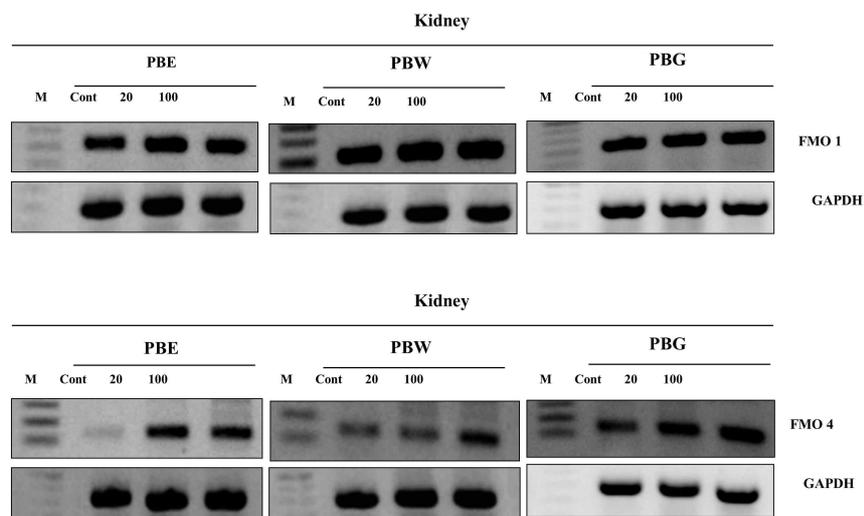


Fig. 3-5. FMO1 and FMO4 expressions in mouse kidney tissue following multiple oral administrations of PBE, PBW and PBG. Each fraction was orally administered at 20 mg/kg and 100 mg/kg (n=3 per group) to ICR mice once per day for 7 days. On day 8, mRNA was extracted from kidney tissues for PCR analysis. PBE: *P. baumii* extract, PBW: *P. baumii* water soluble, PBG: *P. baumii* beta-glucan.

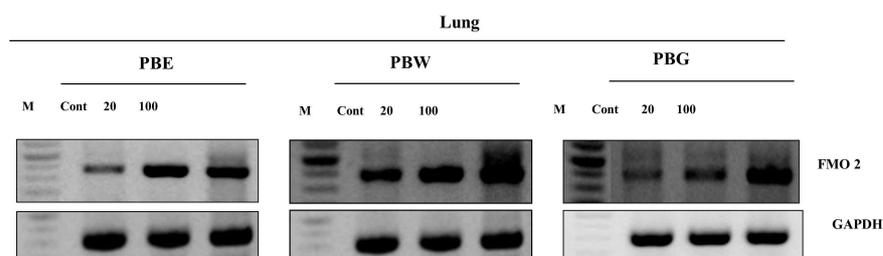


Fig. 3-6. FMO2 expression in mouse lung tissue following multiple oral administrations of PBE, PBW and PBG. Each fraction was orally administered at 20 and 100 mg/kg (n=3 per group) to the ICR mice once per day for 7 days. On day 8, mRNA was extracted from lung tissues for PCR analysis. PBE: *P. baumii* extract, PBW: *P. baumii* water soluble, PBG: *P. baumii* beta-glucan.

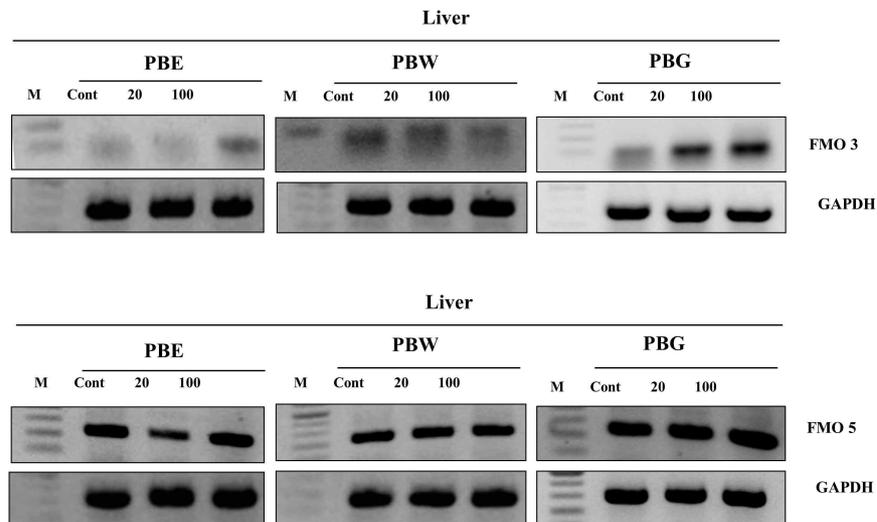
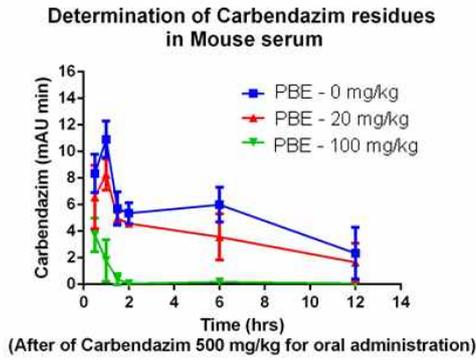


Fig. 3-7. FMO3 and FMO5 expressions in mouse liver tissue following multiple oral administrations of PBE, PBW and PBG. Each fraction was orally administered at 20 mg/kg and 100 mg/kg (n=3 per group) to ICR mice once per day for 7 days. On day 8, mRNA was extracted from liver tissues for PCR analysis. PBE:*P. baumii* extract, PBW:*P. baumii* water soluble, PBG:*P. baumii* beta-glucan.

다. Carbendazim의 마우스의 생체내 대사

대사되지 않은 혈청 carbendazim을 분석하기 위해, carbendazim을 EtOAc로 혈청에서 추출하고 실온에서 건조시켰다. 건조된 carbendazim을 MeOH에 재용해시키고 HPLC 칼럼에 적용하였다. 표준 Carbendazim의 체류 시간은 9.1 분이였다. 각 0, 20, 100 mg/kg의 PBE로 처리된 쥐의 혈청에서 Cmax에 도달하는 시간 (Tmax)과 투여 이후 혈장 carbendazim 농도의 최고치 (Cmax)는 각각 1.0, 1.0 및 0.5 시간이였고, 10.9 ± 1.4 , 8.3 ± 1.2 및 3.7 ± 1.3 이였다. 0, 20 및 100 mg/kg PBE로 처리 한 마우스에서 0.5에서 12 시간 사이의 곡선 아래 면적 (AUC)은 각각 38.6, 29.8 및 6.3 (임의 단위)이였다. 0, 20 및 100 mg/kg PBE로 처리한 마우스에서 혈청 carbendazim의 제거 (CL) 값은 각각 695.3, 665.3 및 25927.1 (임의 단위)이였다 (Fig. 3-8). 따라서 PBE의 투여는 간장 Carbendazim 대사를 촉진시킨다. 신진 대사율은 PBE 농도에 달려 있었다. PBE와 carbendazim을 다른 날에 투여 하였을 때, PBE는 마우스 장관에서 carbendazim 흡수에 영향을 미치지 않았다. FMO 발현의 PBE에 의한 유도는 carbendazim 신진대사의 촉진에 대한 원인일 수 있다.



Time (hrs)	<i>Phellinus baumii</i> extract (mg/kg)		
	0	20	100
0.5	8.35±1.43	6.57±2.39	3.72±1.27
1	10.9±1.37	8.27±1.17	1.79±1.57
1.5	5.7±1.26	4.97±0.47	0.38±0.4
2	5.34±0.79	4.59±0.26	0.06±0.03
6	6±1.31	3.57±1.73	0.17±0.1
12	2.34±1.95	1.66±1.45	0.07±0.04

Fig. 3-8. Effect of PBE on carbendazim absorption and clearance. ICR male mice (n=3 per group) were orally administered PBE at 20 and 100 mg/kg for 7 days followed on day 8 by oral administration of 500 mg/kg carbendazim. Whole blood was removed from the heart at 0.5, 1, 1.5, 2, 6 and 12 h after carbendazim administration. The remaining unmetabolized carbendazim in serum was measured by HPLC.

라. 니코틴 배설 촉진 분석

(1) 혈액 중의 니코틴 분해의 GC 분석

ICR 마우스(*Mus musculus*)에 효모, 보리, 상항버섯의 베타-글루칸을 일주일 동안 경구 투여한 후에, (-)-nicotine tartrate(MP biomedical, LLC, France)를 3 mg/kg 으로 복강 주사로 투여한다. 이후 시간에 따른 니코틴 peak를 GC(Gas chromatography)를 이용하여 측정하기로 하였다. Fig. 3-9는 혈액을 건고시키는 방법과 동일하게 진행된 Nicotine tartrate 표준의 GC peak이다.

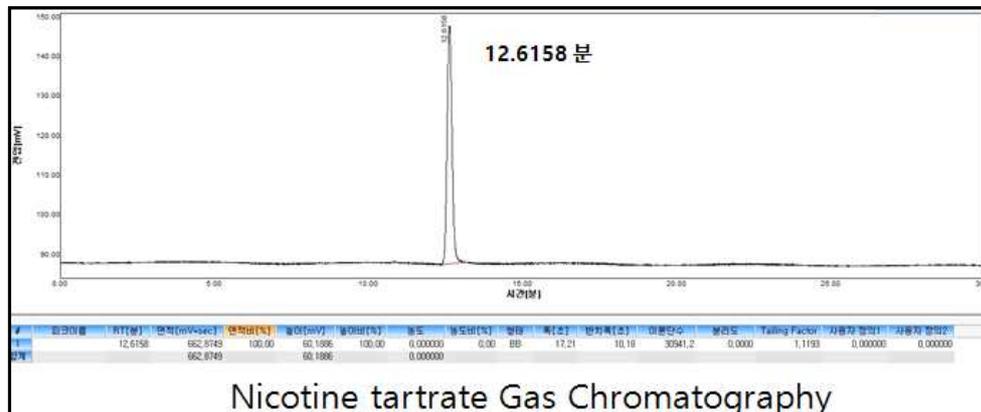


Fig. 3-9. GC analysis of standard nicotine tartrate of serum nicotine tartrate.

이를 비교하여 보았을 때, 11분에 생긴 peak는 클로로포름이란 것과 12분~13분 사

이에 생긴 peak는 니코틴이라는 것을 알 수 있다. 또한, 클로로포름 층으로 건고시킨 방법이라 깨끗한 peak를 구할 수 있었다.

다음으로 Fig. 3-10은 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 이후 Nicotine tartrate를 복강 주사하고 0, 5, 10, 15, 20, 30분 뒤에 sacrifice하여 심장에서 추출한 혈액을 클로로포름 층에 건고시켜 GC로 측정된 그래프이다.

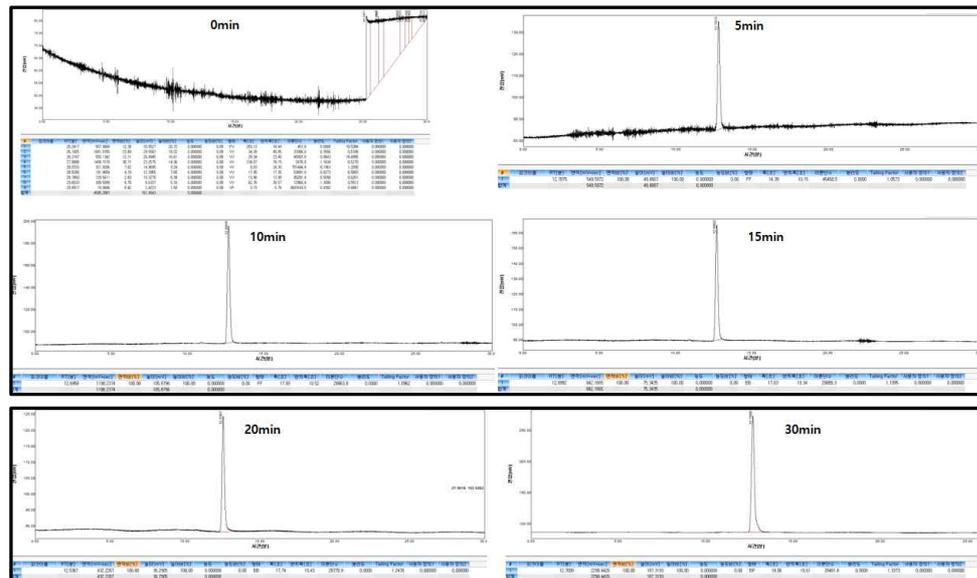


Fig. 3-10. Gas chromatography analysis of nicotine tartrate on 0, 5, 10, 15, 20, 30 minutes from the serum of heart punctured blood.

Nicotine tartrate를 복강 주사한 이후, 즉시 혹은 5분 뒤에 sacrifice하여 채취한 혈액은 peak가 매우 난잡하게 나온 것을 알 수 있다. 가장 적절한 peak값은 10분 뒤에 sacrifice하는 것이었고, 이때의 니코틴 peak 면적이 가장 넓게 나온 것으로, 3차년도에서 진행할 실험은 복강 주사 이후 10분 뒤에 sacrifice하였다. 이와같이 분석한 결과 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸이 혈중의 니코틴 분해를 촉진하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-11). 이러한 결과는 베타-글루칸에 의하여 발현이 증가된 FMO에 의하여 xenobiotic에 해당하는 니코틴의 분해가 촉진된 것으로 추정할 수 있다.

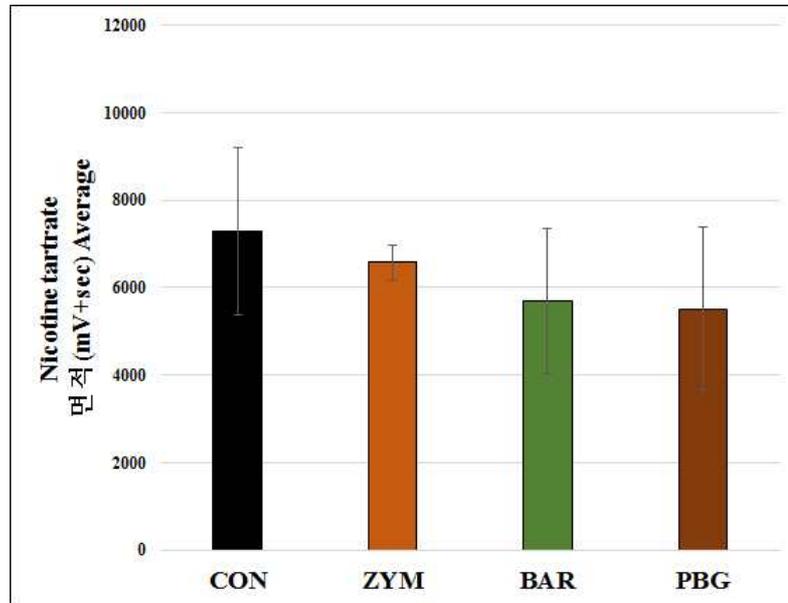


Fig. 3-11. GC analysis of serum nicotine tartrate concentration after 10 min of i.p. injection of nicotine tartrate (3 mg/kg) in ICR mice (n=3, 8-week old). Beta-glucans of zymosan (ZYM), barley (BAR) and *Phellinus baumii* (PBG) were orally administered for 7 days at a concentration of 100 mg/kg. GC analysis: ACME 6000 GC (Young Lin, Korea), He rate : 1.0 ml/min, inj temp: 250°C, Oven temp: 270 °C /5 min 250 °C /10 min, detector temp: 300°C, carrier gas: He. H₂: 50, air: 200, He: 20. Packed column: stainless steel.

마. 상황버섯, 효모 및 보리의 베타-글루칸의 효능 비교

상황버섯의 베타글루칸 이외에 효모와 식물 유래의 베타글루칸도 효능이 있는지 검증하기 위하여 효모유래의 베타글루칸인 자이모산(zymosan)과 보리에서 추출한 베타글루칸을 상황버섯의 베타글루칸인 PBG와 비교 실험을 수행하였다.

SD rat(*Rattus norvegicus*, 8 weeks)를 사육하면서 1주일간의 안정화 과정을 거친 후에 상황버섯, 효모, 식물 유래의 베타글루칸을 1주일간 경구로 투여하였다. 7일 후에 실험동물을 마취치사하여 간과 신장 장기를 적출하여 총RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후에 real time PCR을 수행하였다.

(1) 상황버섯, 효모 및 보리의 베타-글루칸의 FMO2의 발현 분석

랫트에 상황버섯 베타-글루칸(100 mg/kg), 효모 베타-글루칸(100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(100 mg/kg)을 7일간 경구투여한 후에 간과 신장을 적출하여 총RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후에 real time PCR을 수행한 결과는 Fig. 3-12와 같다.

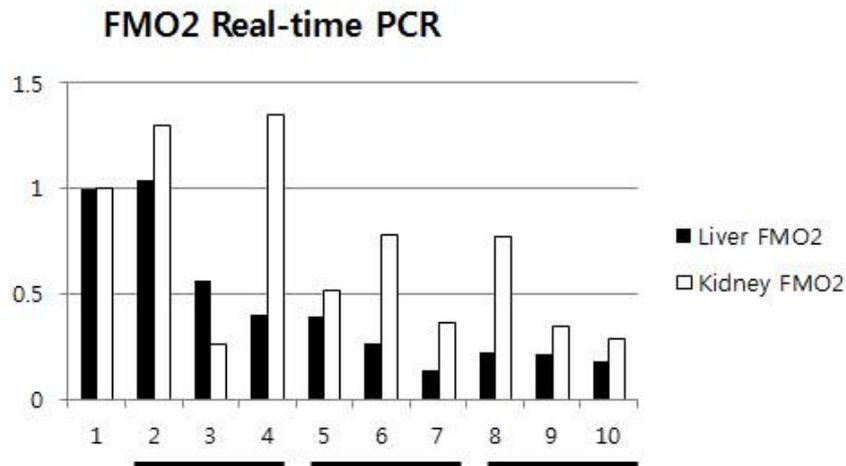


Fig. 3-12. Real-time PCR analysis of FMO2 in liver and kidney tissues. Lane 1: control; lanes 2, 3 and 4: *Phellinus baumii* (PBG) 100 mg/kg; lanes 5, 6 and 7: yeast beta-glucan 100 mg/kg, lanes 8, 9 and 10: barley beta-glucan 100 mg/kg.

(2) 상황버섯, 효모 및 보리의 베타-글루칸의 FMO3의 발현 분석

랫트에 상황버섯 베타-글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg), 효모 베타글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg)을 7일간 경구투여한 후에 간을 적출하여 총RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후에 real time PCR을 수행한 결과는 Fig. 3-13과 같다.

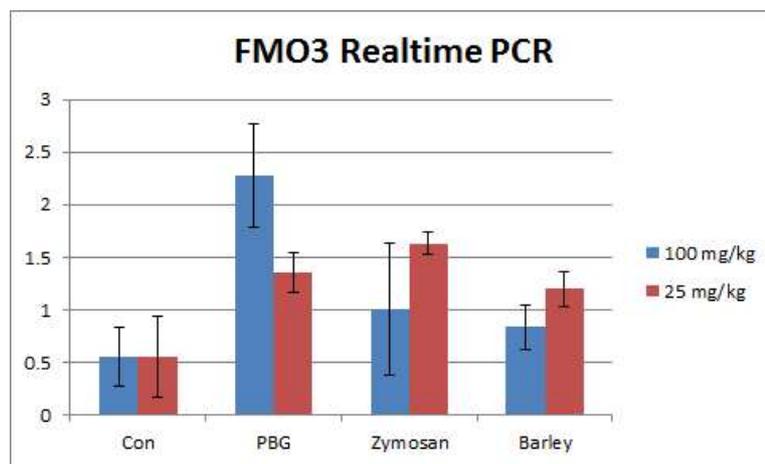


Fig. 3-13. Real-time PCR analysis of FMO3 in mouse liver tissue. Con : control; PBG: *Phellinus baumii* beta-glucan; Zymosan: yeast beta-glucan, Barley: barley beta-glucan. Each was p.o. injected at 100 mg/kg and 25 mg/kg.

(3) 상황버섯, 효모 및 보리의 베타-글루칸의 FMO4의 발현 분석

랫트에 상황버섯 베타-글루칸(100 mg/kg), 효모 베타글루칸(100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(100 mg/kg)을 7일간 경구투여한 후에 간과 신장을 적출하여 총RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후에 real time PCR을 수행한 결과는 Fig. 3-14와 같다.

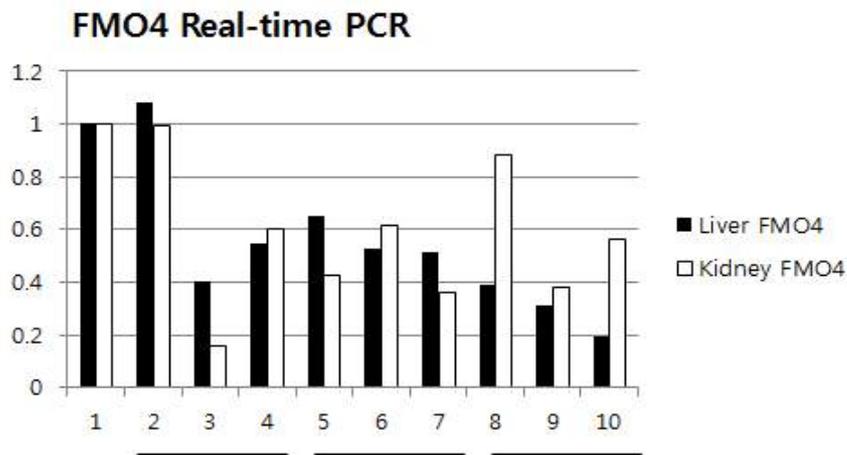


Fig. 3-14. Real-time PCR analysis of FMO4 in liver and kidney tissues. Lane 1 : control; lanes 2, 3 and 4 : *Phellinus baumii* (PBG) 100 mg/kg; lanes 5, 6 and 7: yeast beta-glucan 100 mg/kg, lanes 8, 9 and 10: barley beta-glucan 100 mg/kg for 7 days p.o. injection.

FMO2와 FMO4는 약간의 감소 경향을 보였으나 발현양이 작아 큰 의미를 가지지 못하며, microarray 상에서 가장 큰 변화를 나타내었던 FMO3를 FMO3가 가장 많이 발현되는 장기인 liver에서의 유전자 발현량 변화를 real-time PCR을 통해 측정 한 결과, 모든 실험군에서 증가한 결과 값을 나타내었고, 특히 상황버섯 베타-글루칸 100 mg/kg 투여군에서 4.1배 증가한 결과를 나타내었다. 효모 베타-글루칸과 보리 베타-글루칸은 100 mg/kg보다 25 mg/kg에서 더 큰 증가를 보였으나 오차범 위 내에 있으므로 유효하다고 판단된다.

(4) 상황버섯, 효모 및 보리의 베타-글루칸이 랫트의 소변중의 악취원인물질인 TMA의 대사촉진에 미치는 영향 (GC 분석)

소변중의 악취원인 물질은 TMA (trimethylamine)가 대표적이며, TMA의 분석은 GC(gas chromatography)로 분석하였다. 상황버섯의 베타글루칸 이외에 효모와 식물 유래의 베타글루칸도 효능이 있는지 검증하기 위하여 효모유래의 베타글루칸인

자이모산(zymosan)과 보리에서 추출한 베타글루칸을 상황버섯의 베타글루칸인 PBG와 비교 실험을 수행하였다. 랫트에 상황버섯 베타-글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg), 효모 베타글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(25 mg/kg, 100 mg/kg)을 7일간 경구투여하며 매일 소변을 수집하여 분석하였다. 7일간 베타글루칸을 투여한 후에 소변중의 악취성분인 TMA의 변화는 Fig. 3-15에 나타내었다. 악취 물질은 Trimethylamine이 베타-글루칸 투여에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이스트 베타-글루칸의 경우 25 mg/kg에서 100 mg/kg보다 더 큰 감소 경향을 나타내었지만 오차범위 내에 있으므로 유의미 하다고 판단되었다.

결과적으로 5 mg/kg으로 상황버섯, 효모, 보리베타-글루칸을 경구투여시 하루중 TMA 배출량이 각각 19, 30, 52% 감소한 것을 확인하여 3 종의 베타-글루칸 모두 5 mg/kg 경구투여에서 하루중 TMA 배출량을 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 3-16).

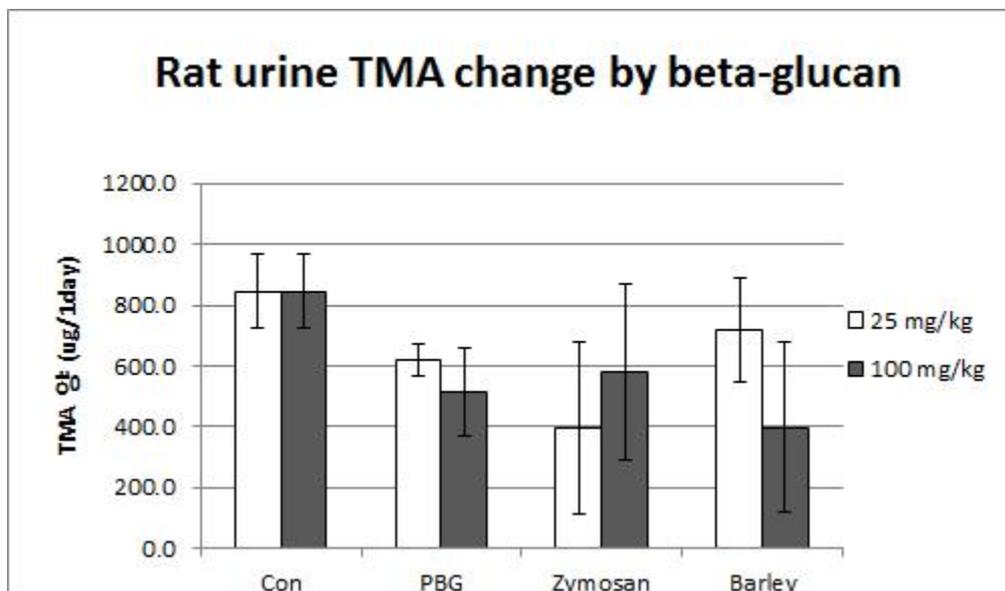


Figure 3-15. SPME-GC/MS analysis of excreted TMA amount in rat urine on day 7. The β -glucan was orally administered into the SD rat at the concentrations of 25 and 100 mg/kg once a day for 7 days. After pre-treatment for 7 days, rat's urine were collected in metabolism cage (n=3, for each group). TMA concentrations of collected urine were measured by SPME-GC/MS(Agilent 6890, Agilent). PBG : *Phellinus baumii* β -glucan, zymosan : yeast β -glucan, barley : barley β -glucan.

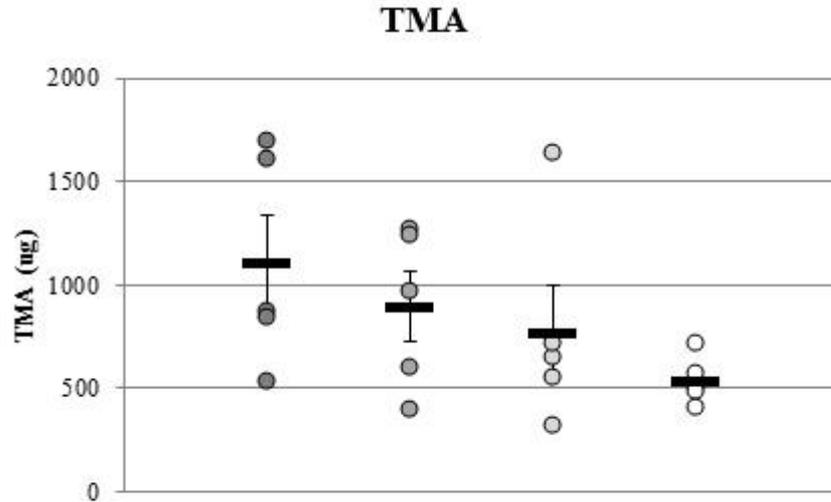


Fig. 3-16. Headspace GC analysis of excreted TMA amount in rat urine on day 7. The β -glucan was orally administered into the SD rat at the concentration of 5 mg/kg once a day for 7 days. The urine of rat was collected in metabolism cage (n=5, for each group). TMA concentrations of collected urine were measured by headspace-GC (ACME 6100, Young-Lin). PBG : *Phellinus baumii* β -glucan, zymosan : yeast β -glucan, barley : barley β -glucan. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs con.

제 2 절 Corin의 유전자 발현과 효능

1. 실험적 접근방법

가. Beta-glucan의 추출 및 분획

상황버섯의 가루 형태를 열수 추출한 상태를 PBE (*Phellinus baumii* water extract) 라고 하고, 이를 ethanol을 이용하여 여과한 상층액을 PBW (*Phellinus baumii* supernatant water), ethanol에 침전된 성분을 PBG (*Phellinus baumii* beta-glucan) 이라고 정하였다. 해당 PBE, PBW, PBG를 Mushroom and yeast beta-glucan assay kit (K-YBGL, Megazyme, Ireland)로 96-well plate (Black plate clear bottom, Costar, USA)에서 수행하였다. 한편 효모 beta-glucan은 Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* for inducing inflammatory response (CAS Number 58856-93-2, Sigma Aldrich Korea)을 사용하였다. Beta-glucan을 경구투여 하기 위하여, 생후 8주령의 수컷 ICR 마우스 (Samtako, Korea)를 실험실에서 일주일 적응 시킨 후에, 효모, 상황버섯의 beta-glucan을 100 mg/kg/day로 일주일간 1일 1회 경구투여를 진행하였다.

나. Corin 유전자 발현 분석

(1) mRNA 추출

하나의 그룹당 생후 8주된 4마리의 수컷 SD 랫트(Samtako, Korea)에 각 효모, 상황버섯의 beta-glucan을 100 mg/kg/day로 일주일 동안 경구투여한 뒤에 CO₂로 치사 후, 간과 신장 조직을 추출하였다. PBS(Phosphate Buffered Saline)로 washing 작업을 거쳐 1 ml의 Trizol agent (Favorgen, Korea)을 넣어 5분간 lysis 시켰다. 후에 Chloroform(Sigma Aldrich Korea) 250 l를 더해 vortexing 후 상온에서 5분간 둔 뒤 10,000 rpm에서 원심 분리하였다. RNA가 포함된 상층액을 새 tube에 옮기고 550 l의 isopropanol (Sigma Aldrich Korea)을 넣어 섞은 뒤 상온에 5분간 두고 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었다. 상층액은 제거하고 1 ml 75% ethanol/DEPC로 washing 작업을 거친 후 9,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 ethanol을 제거하고 RNase-free water (DEPC-water)에 일정 농도로 맞추어 녹여 -80°에서 보관하였다.

(2) cDNA 합성

mRNA 2 g에 oligo dT (Enzymomics, Korea)와 DEPC-water를 넣어 총 10 ml로 맞춘 후에 70°C에서 10분 동안 incubation 시켜주고 4°에서 5분 동안 incubation 하였다. 5 x reaction buffer (Enzymomics, Korea), 10 Mm dNTP (Promega, USA), M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA), DNase-free water를 추출한 RNA에 처리하여 42°C에서 1시간 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였다. 이는 농도 측정 후에 각 sample 농도를 일정하게 맞추고 -20°C에서 보관하였다.

(3) Real-time PCR 수행

Realtime PCR plate (Multiplate PCR plates 96-well clear, Bio-rad, USA)에 2 X Ampigene qPCR Green Mix Lo-Rox (Enzo Life Science, Korea), forward primer, reverse primer, template DNA, deionized distilled H₂O를 넣고 Optical Adhesive covers (Applied Biosystems, USA)를 덮었다. 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 Realtime-PCR (CFX-Connect, Bio-rad, USA)기기를 이용하여 polymerase activation 2분, 95°C, 1 cycle, denaturation 5초, 95°C, annealing/extension 30초, 65°C, 40 cycles로 수행하였다.

다. Corin 단백질 발현 분석

(1) 단백질 추출

RNA를 추출하였던 방법과 같이 생후 8주된 9마리의 ICR마우스에 각 효모, 상황버섯의 beta-glucan을 100 mg/kg/day로 일주일 동안 경구투여한 뒤에 심장, 간, 신장 조직을 추출하여 PBS로 washing 작업을 거쳤다. 조직의 0.5 g과 1 ml Protein extraction solution(PRO-PREP Protein Extraction Solution, Intron,

Korea)을 homogenizer (Wheaton, USA)에 넣고 4?에서 분쇄하고 bead-beater (TACO-prep, Phile Korea)로 lysis하였다. 이를 4°C, 600 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮긴 후, 4°C, 15,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액만 분리해내었다. 해당 상층액을 4°C, 15,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 이를 한번 더 시행하였다. Brad assay방법인 Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-rad, USA)를 Ultra-pure distilled water (Invitrogen Korea)에 희석하여 만든 1 x solution에 분리한 수용성 단백질 2 l를 넣고 Spectrometer (OPTIZEN 2120UV, MECASYS, Korea) 기기를 이용하여 농도를 측정하였다. Sample은 -80°C에서 보관하였다.

(2) 마우스 조직 단백질의 Coomassie staining 분석

SDS-PAGE gel 10%(Mini-protean TGX Precast Gels, Bio-rad, USA)로 80 V, 1시간 10분 전기영동하여 separating gel만 분리하고 deionized distilled water(ddH₂O)로 rocking하여 washing하였다. Coomassie stain을 gel에 덮을 만큼 넣고 20초 가열하여 staining solution이 끓을 때를 확인한 뒤, 10분 rocking table에서 incubation하였다. ddH₂O로 2번 washing 작업을 거치고 destaining solution을 gel에 덮을 만큼 넣고 20초 destaining solution이 끓을 때까지 가열한 뒤, 10분 rocking table에서 incubation하였다. 이후 새로운 destaining solution으로 갈아준 뒤에 rocking table에서 O/N하여 incubation하였다.

(3) Western-blot으로 마우스 조직 단백질 중 Corin 발현 분석

마우스의 단백질 농도가 50 g이 되도록 4x sample loading buffer (Novagen, USA)를 넣어 100°C에서 10분간 끓여 단백질 구조가 풀리도록 하였다. SDS-PAGE gel 10% (Mini-protean TGX Precast Gels, Bio-rad, USA)에 단백질 marker (Broad-way prestained protein marker, Intron, Korea) 10 l, sample을 각 15 l씩 80°C에서 1시간 10분 전기영동을 실시하였다. Stacking gel은 제거하고 separating gel만 이용하여 semi-dry transfer (Trans-blot SD Semi-dry transfer cell, Bio-rad, USA)기기를 이용하여 아래쪽이 (-)charge를 띄므로 NC membrane (Trans-blot transfer medium, Bio-rad, USA)을 아래쪽으로 하고 그 위에 gel과 transfer buffer로 20분간 rocking한 3M paper 2장을 깔고 15 V, 55분 동안 transfer 하였다. Transfer가 끝난 NC membrane은 상온에서 1시간 5% milk solution (Blotto non-fat dry milk, Santa cruz, USA)으로 blocking한 후에, beta-actin (CAS Number sc-47778 HRP, Santa cruz, USA)과 Corin (CAS Number sc-293360, mouse monoclonal IgG1, Santa cruz, USA) 1차 항체를 1 : 1,000으로 4?에서 O/N처리하였다. 이후 TBS-T buffer(1 M Tris-Cl, 5 M NaCl, H₂O, Tween 20)로 2시간 washing하고 2차 항체로는 1차 항체 host와 같은 goat anti-mouse IgG를 사용하여 1 : 1,000으로 1시간 처리하였다. 이후 TBS-T buffer로 2시간 washing 후, ECL solution (Western blot detection kit, LOT Number PMA05, Yong In Frontier, Korea)의 detection solution A와 B를

1 : 1 로 하여 NC membrane에 처리하고 암실에서 필름 현상으로 band를 확인하였다.

라. ANP peptide 발현 분석

8주령 수컷 ICR마우스에 각 효모, 상황버섯의 beta-glucan을 100 mg/kg/day로 일주일 동안 경구투여한 뒤에 CO₂로 마취치사하여 심장에서 100 1 헤파린 나트륨 (1,000 I.U./ml, 중외제약, Korea)을 넣은 1 ml의 syringe (1 ml Kovax syringe, Korea Vaccine)로 혈액을 추출하였으며, 심장, 간, 신장 조직에서 이전 방법과 같이 단백질을 추출하였다. 심장에서 추출한 혈액과 심장, 간, 신장 조직에서 추출한 단백질을 ANP enzyme immunoassay kit (Human/Mouse/Rat ANP Enzyme Immunoassay Kit, Raybio, USA)를 이용하여 2차 항체가 붙어 있는 96-well ANP microplate(Item A)로 측정하였다.

마. 소변 내 나트륨 배출 분석

(1) Metabolic cage 이용

8주령 수컷 ICR마우스를 일반 cage에서 4 마리/cage로 일주일 동안 환경에 적응시킨 후, metabolic cage 하나에 같은 환경에 적응된 2마리씩 5일 동안 새로운 cage환경에 적응시켰다. 이때 사료는 일반 사료 (sodium 1%)로 하였고 이후 21일 동안은 대조군과 실험군 각각 일반 사료 (sodium 1%)와 고농도-나트륨 사료 (sodium 10%)로 바꾸어 섭취시켰다(Figure 1).

(2) Sodium-assay kit 시행

Metabolic cage 한 그룹당 4마리로 하여 5일 동안 환경에 적응시킨 이후, 매일 같은 시간에 효모, 상황버섯의 beta-glucan 100 mg/kg/day로 경구 투여하며, 21일 동안 대조군과 실험군 모두 일반 사료 (sodium 1%)와 나트륨 고농도 사료 (sodium 10%)로 섭취시켰다. 그와 동시에 몸무게, 사료 섭취량, 증류수량을 측정하고 소변을 모아 4°C에서 일주일 보관 후, Sodium-assay kit (K391-100, Biovision, USA)을 이용하여 96-well clear plate with flat bottom에서 소변 내의 나트륨 양을 측정하였다.

2. 연구결과

가. Microarray를 이용하여 베타-글루칸 투여 시, 발현 유전자 분석

ICR 마우스의 일주일 안정화 기간 이후, 일주일 간의 베타-글루칸 100 mg/kg으로 경구 투여하고 sacrifice하여 간 조직을 적출하였다. mRNA를 추출하여 cDNA로 합성하고 microarray 방법을 이용하여 증가하는 유전자와 감소하는 유전자를 분석하였다 (Tables 3-6, 3-7).

Table 3-6. Microarray analysis of mouse liver tissue following single and multiple oral administrations of 100 mg/kg PBE.

Analysis of design	Cutoff	Regulation	Number of Significant Gene	Number of GO information	Number of Pathway Information
Control vs PBE-100	1.3	DOWN	1264	901	282
		UP	1184	925	349
	1.5	DOWN	292	184	75
		UP	328	226	93
	2	DOWN	61	31	14
		UP	45	36	18
	3	DOWN	22	1	0
		UP	9	8	7

*PBE-100 : 베타-글루칸 100 mg/kg. Microarray 방법을 이용하여 분석한 결과, 3배 이상 감소한 유전자는 22개이고 3배 이상 증가한 유전자는 9개인 것으로 밝혀졌다.

Table 3-7. Microarray analysis of mouse liver tissue following multiple oral administrations of 100 mg/kg PBE.

NO	Gene Symbol	Accession Number	Liver Control	Liver PBE-100	Average Fold Change
1	Fmo3	NM_008030	7.0	11.2	17.6
2	Mt2	NM_008630	10.2	13.7	11.3
3	Cyp46a1	NM_010010	7.8	10.9	8.8
4	Corin	NM_016869	6.6	9.2	5.8
5	Mt1	NM_013602	9.5	11.7	4.6
6	Akr1e1	NM_018859	7.8	9.9	4.2
7	Plk3	NM_013807	9.1	11.1	3.8

PBE-100 : 베타-글루칸 100 mg/kg. ICR 마우스에 베타-글루칸 100 mg/kg 일주일 동안 경구투여 시, 2배 이상 증가한 유전자들 중 Corin 유전자는 대조군에 비해 5.8 배 증가하였다.

나. Macrophage cell line을 사용하여 세포내에서 Corin 유전자의 발현분석

상황버섯의 베타-글루칸 이외에 효모와 식물 유래의 보리 베타-글루칸도 효능이 있는지 검증하기 위하여 효모 유래의 베타-글루칸인 자이모산 (zymosan)과 보리 (barley) 에서 추출한 베타-글루칸(sigma)을 상황버섯의 베타-글루칸과 비교 실험을 수행하였다. in vitro 차원에서의 마우스 macrophage 세포인 RAW264.7 세포를 배양하면서 한 달가량의 안정화 과정을 거친 후에 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸을 overnight 하

여 처리하고 세포에서 mRNA를 추출하였다. RAW264.7 세포에는 베타-글루칸의 수용체인 dectin-1이 있기 때문에 추측 가능한 결과를 예상하며, positive control로써는 LPS를 양성대조군으로 삼았다.

다. 간에서 Corin 유전자 및 단백질 발현 증가 분석

랫트 (*Rattus Norvegicus*)를 사육하면서 일주일간의 안정화 과정 이후 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸을 일주일간 경구로 투여 후에, 경추탈골 법으로 치사, 간 조직을 적출하여 real time PCR을 수행하였다. 또한, ICR 마우스 (*Mus musculus*)의 경우는 같은 사육 방식과 경구 투여 방식 이후, 총 단백질을 분리하여 Coomassie staining 법으로 Corin 단백질의 위치를 확인하고, Western blot을 이용하여 Corin 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

(1) 랫트에 베타-글루칸 경구 투여 후, 전사 단계의 Corin 발현양 측정

랫트(*Rattus Norvegicus*)에 상황버섯 베타-글루칸(100 mg/kg), 효모 베타-글루칸(100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(100 mg/kg)을 일주일간 경구 투여한 후에 간 조직을 적출, 총RNA를 분리하여 cDNA를 합성하여 수행한 real time PCR의 결과는 Fig. 3-17 및 Fig. 3-18과 같다.

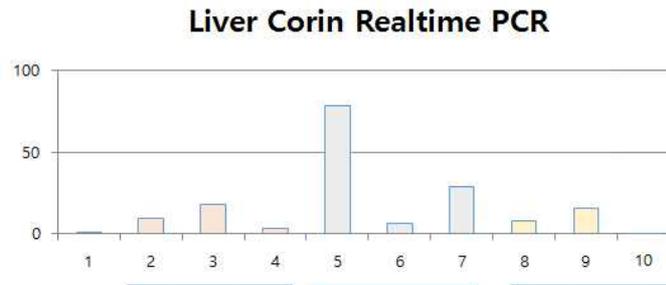


Fig. 3-17. PCR analysis of rat liver corin by real-time PCR (n=3).

Lane 1 : control; lanes 2, 3 and 4 : 상황버섯 베타-글루칸 (*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg, lanes 5, 6 and 7 : 효모(Zyмосan) 베타-글루칸 100 mg/kg, lanes 8, 9 and 10 : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin 발현양 측정. AmpGene qPCR Green Mix Hi-Rox(Enzo), ABI-7000에서 측정, Polymerase activation 2 min, 95°C, 1 cycle, Denaturation 5 sec, 95 °C, Annealing/Extension 30 sec, 65 °C, 40 cycles. 18s rRNA Forward : ACC GCA GCT AGG AAT AAT GGA ATA, Reverse : CTT TCG CTC TGG TCC GTC TT. Corin Forward : GTC CGC ATT ATT CCT CTG GA, Reverse : CAA ACC AGA GGA CCA CCA CT.

Liver Corin Realtime PCR

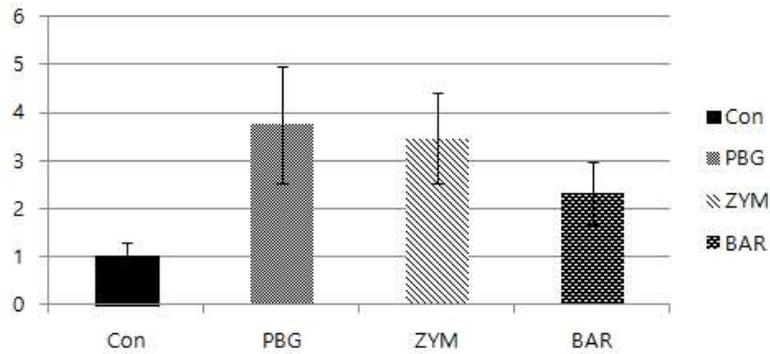


Fig. 3-18. Real-time PCR analysis of rat liver corin (n = 3). Con : control(3차 증류수), PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg, ZYM : 효모(Zyimosan) 베타-글루칸 100 mg/kg, BAR : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin발현양 평균 값 측정.

(2) 마우스에 베타-글루칸 경구 투여 후, 번역 단계의 Corin 발현양 측정

ICR 마우스(*Mus musculus*)에 효모 베타-글루칸 (100 mg/kg), 보리 베타-글루칸(100 mg/kg), 상황버섯 베타-글루칸 (100 mg/kg)을 일주일간 경구 투여한 후에 간 조직을 적출하여 총 단백질을 분리하여 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하였다. Stacking gel을 분리하여 제거한 후에, seperating gel만 Coomassie staining 법을 이용하여 염색한 결과는 Fig. 3-19와 같다.

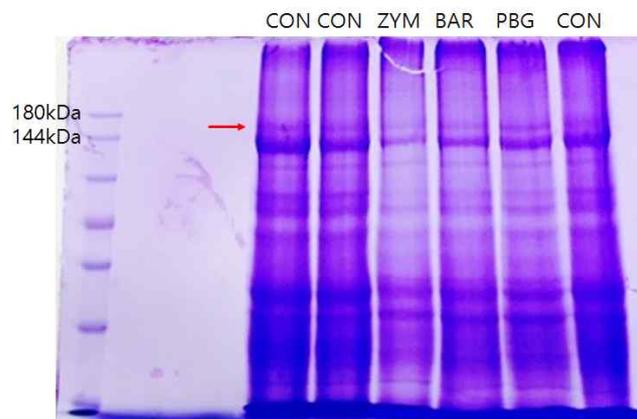


Fig. 3-19. Coomassie staining for the identification of corin. (CON : Control; ZYM : 효모(Zyimosan) 베타-글루칸 100 mg/kg; BAR : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg; PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin 단백질 발현양 측정.)

Control 단백질 자체가 매우 진하게 염색된 것으로 보아 Control 마우스 군의 총 단백질이 베타-글루칸을 투여한 마우스 군의 총 단백질보다 농도가 짙음을 알 수 있다. 그럼에도 불구하고, 180 kDa과 144 kDa 사이의 band가 Corin이라고 추측하건대 해당 band가 Control 과 베타-글루칸 그룹의 비교 에서 비슷한 농도로 보인다. 즉, 단백질 농도를 같게 맞추어 실험한다면, 베타-글루칸 그룹의 Corin 단백질 발현이 더 높게 나올 수 있다는 가능성을 보여주었다.

이를 토대로 Western blot을 시행하였다. 먼저 일주일 동안 베타-글루칸을 경구 투여 진행한 마우스의 심장, 폐, 간, 비장, 신장의 조직을 적출하여 Corin 단백질을 분석해 보았다. 항체는 Santa Cruz사의 Corin anti-body (M-225, SC-67179)를 사용하였으며, 2차 항체는 Santa Cruz사의 goat anti-rabbit IgG-HRP를 사용하였다 (Fig. 3-20).

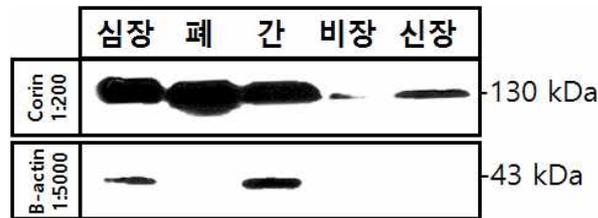


Fig. 3-20. Western blot of mouse corin expression in heart, lung, liver spleen and kidney. (효모(Zymosan) 베타-글루칸 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 심장, 폐, 간, 비장, 신장 조직에서 Corin 단백질 발현양 측정.)

결과에서와 같이 단백질의 positive control 발현인 베타액틴이 발현되는 심장과 간에서의 Corin 단백질의 발현 농도가 짙다고 볼 수 있겠다. 앞서 선행 연구에서 mRNA의 전사 단계에서 Corin 유전자 발현이 간 조직에서 높게 나온 것과의 결과를 바탕으로 Corin 단백질 분석은 간 조직에서 시행하였다.

아래의 Fig. 3-21에서 Fig. 3-23은 각 마우스에 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸을 일주일간 경구 투여 후, 간 조직에서 단백질을 추출하여 Western blot을 시행한 결과이다.



Fig. 3-21. Western blot of mouse corin expression in liver tissue. (Con : Control; Zym : 효모(Zymosan) 베타-글루칸 100 mg/kg; Bar : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg; PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7

일간 경구 투여 후 간에서 Corin 단백질 발현양 측정.)

Corin 단백질은 Atrial Natriuretic peptide (ANP)의 converting enzyme으로써 활성화되는데, 이때 Corin 단백질의 Protease 부분이 Pro-ANP의 N-terminal peptide 부분을 떨어트려 Mature-ANP를 형성시킨다. 이후, R801-1802 activation site가 끊어져 Protease 부분이 떨어지게 되는데, 이를 Corin-p라 부른다. 다음의 Fig. 3-22와 Fig. 3-23은 Corin과 부수적인 먼인 Corin-p의 Western blot 결과이다.

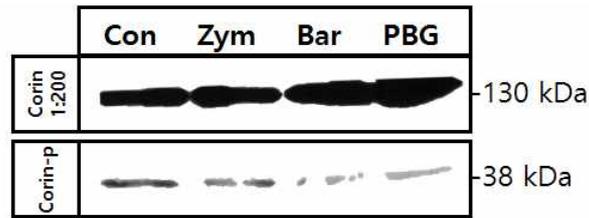


Fig. 3-22. Western blot of mouse corin expression in liver tissue. (Con : Control; Zym : 효모(Zymosan) 베타-글루칸 100 mg/kg; Bar : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg; PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin, Corin-p 단백질 발현양 측정.)

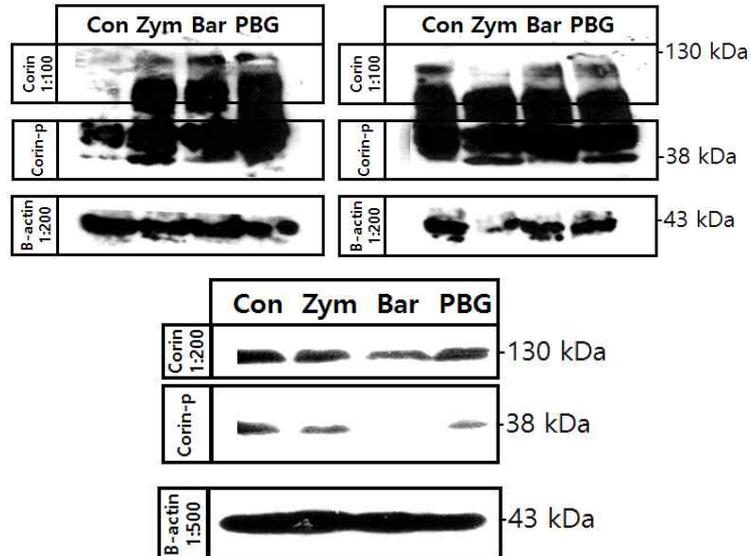


Fig. 3-23. Western blot of mouse corin expression in liver tissue. (Con: Control; Zym: 효모(Zymosan) 베타-글루칸 100 mg/kg; Bar: 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg; PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7일간

경구 투여 후 간에서 Corin, Corin-p, 베타액틴 단백질 발현양 측정.)

그렇다면, Corin-p 부분이 활성화된다면, Pro-ANP의 N-terminal peptide 부분이 떨어져 mature-ANP가 발현되는지를 확인해보아야 한다. 그에 대한 항체는 Novus biological사의 ANP anti-body (NBP2-14873)를 사용하였다. 다음의 Fig. 3-24와 Fig. 3-25는 Corin과 부수적인 면인 Corin-p로 인한 ANP의 발현 정도를 Western blot으로 나타낸 결과이다.

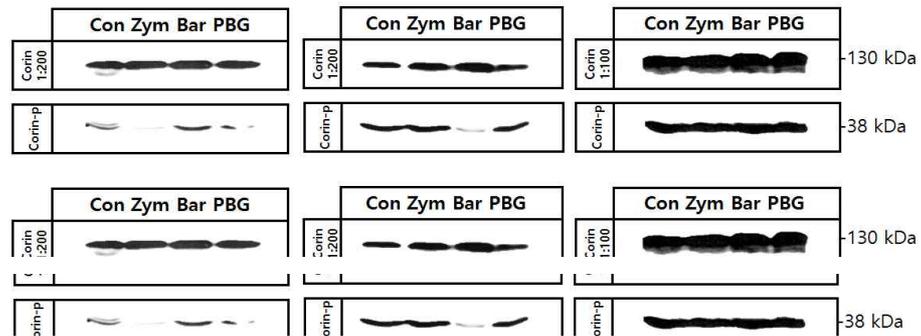


Fig. 3-24. Western blot of mouse corin expression in liver tissue. (Con: Control; Zym : 효모(Zyosan) 베타-글루칸 100 mg/kg, Bar : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg, PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin, Corin-p, Pro-ANP 단백질 발현양 측정.)

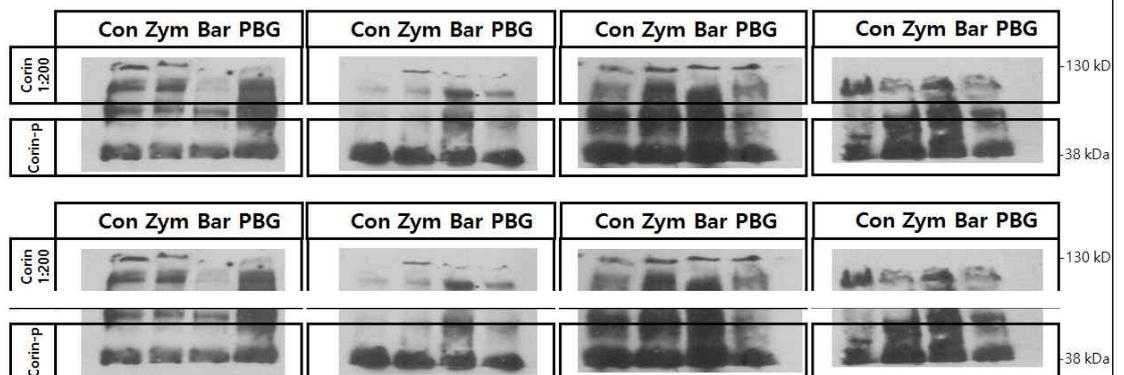


Fig. 3-25. Western blot of mouse corin and ANP expression in liver tissue. (Con: Control; Zym : 효모(Zyosan) 베타-글루칸 100 mg/kg; Bar : 보리 베타-글루칸(Beta glucan from Barley) 100 mg/kg; PBG : 상황버섯 베타-글루칸(*Phellinus baumii* beta glucan) 100 mg/kg으로 7일간 경구 투여 후 간에서 Corin, Corin-p, Mature-ANP 단백질 발현양 측정.)

전체적인 경향으로 보았을 때, 효모와 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 마우스에서는 Corin 단백질과 Corin-p가 발현되는 것을 볼 수 있었으나, 보리의 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 마우스에서는 Corin 단백질은 발현되나, Corin-p가 발현되는 것에서는 어려움을 볼 수 있다. 또한 Control군과 비교해 보았을 때, 더 많이 발현된다고 보기는 어렵다. 하지만, 그 결과가 일관되지 않기 때문에 추후 실험이 필요하다. 이번 실험에서 결과의 다양성이 나타난 이유는 Corin 단백질이 막 단백질이기 때문에 간 조직에서 단백질 추출 시, 제대로 분리가 되지 않았기 때문이라고 본다. 차후에는 17 kDa의 Pro-ANP의 발현 결과는 Corin이 Convertase로써 mature-ANP를 발현시킨다는 것을 증명할 결과로써 미흡하기 때문에, Mouse ANP EIA kit (Raybiotech사, EIAM-ANP-1)를 이용하여 mature ANP의 발현과 비교하여 결과를 보는 것이 중요하다.

본 과제에서 상황버섯의 베타-글루칸에 의하여 corin의 발현이 증가됨을 입증하였으며, 증가된 corin은 ANP의 생성을 촉진하였다. 생성된 ANP는 Wnt receptor인 Frizzled에 경쟁적으로 결합하여 Wnt의 신호전달을 차단한다. Wnt 신호전달이 차단되면 beta-catenin의 핵이동이 억제되어 cyclin D1, c-myc 등의 발현이 억제되어 항암작용을 나타낸다. 본 과제에서는 상황버섯의 베타-글루칸의 항암작용기전은 면역촉진이외에도 Corin에 의한 항암작용이 나타날 수 있다는 새로운 기전을 밝혀낸 것이 큰 성과이다 (Fig. 3-26).

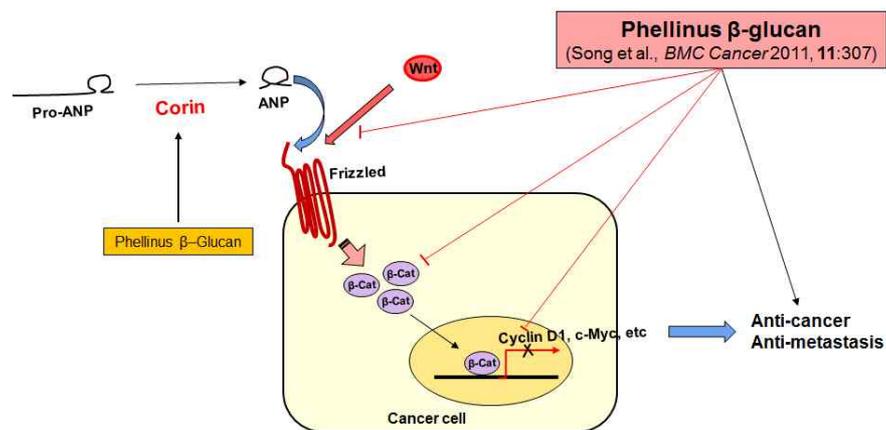


Fig. 3-26. Newly found anticancer mechanism that was competitive binding of ANP and Wnt by the oral administration of beta-glucan from *P. baumii*

라. 마우스에서 나트륨 배설 촉진

본 과제에서 베타-글루칸에 의하여 Corin 유전자의 발현이 증가함을 발견한 것은 획기적인 연구결과이며, 세계 최초로 찾아낸 우수한 결과이다. Corin 유전자 발현이 증가하면 신장에서 나트륨의 배설이 촉진되어 혈압이 저하하는 것으로써 (Fig. 3-27), 베타-글루칸에 의한 혈압저하작용기전을 세계최초로 밝혀내게 되었다.

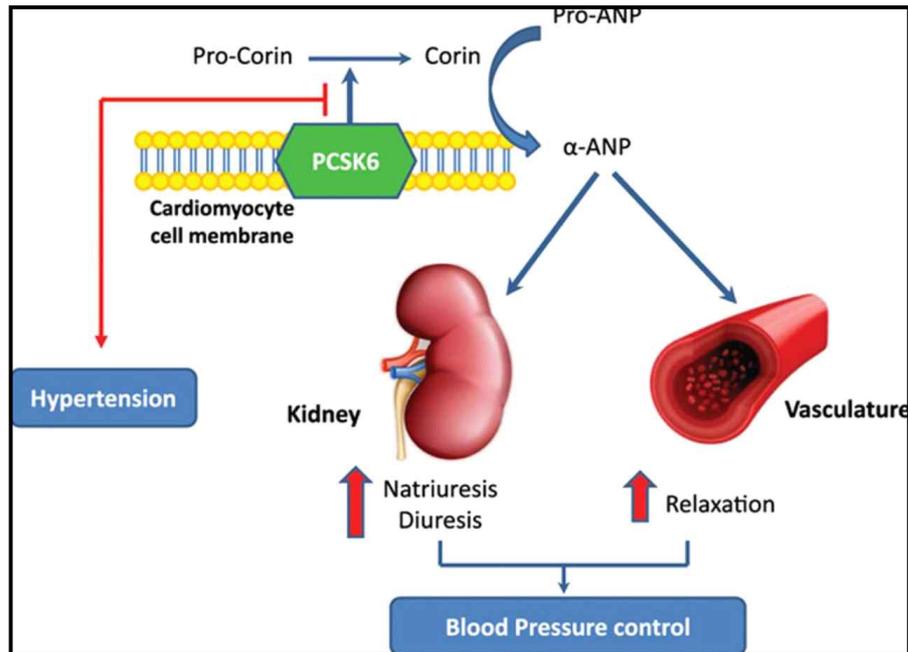


Fig. 3-27. Antihypertensive mechanism of corin in kidney by excretion of Na^+ in kidney. (본 과제에서는 베타-글루칸을 동물에 투여하면 Corin의 발현이 증가됨을 밝혀내었으며, 증가된 Corin에 의하여 ANP생성이 촉진되면 나트륨배설이 촉진됨.) (Cited from Volpe and Rubattu. *Circ Res.* 2016; 118: 196-198)

(1) 소변 중 나트륨 농도 분석

베타-글루칸으로 인해 증가된 Corin 유전자가 혈압 저하 작용에 영향을 미친다는 결과를 소변 중 나트륨 배설 농도 분석으로 실험을 수행하였다. 랫트(*Rattus norvegicus*)에 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg을 일주일간 경구 투여하며 매일 소변을 수집하여 4°C에서 보관하였다. 소변양은 3차 증류수를 이용해 동일하게 맞춰주었으며, 이를 외부 기관인 고려대학교 공동기기원 KBSI에 의뢰하여 Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer (ICP-AES)를 통하여 측정하였다. ICP-AES로 측정한 소변 내 나트륨의 농도는 Table 3-8에 나타내었다.

Table 3-8. 베타-글루칸 100 mg/kg 일주일 경구 투여 후, 소변에서의 나트륨 배출, ICP-AES

Sample	Na	Cd	Cr	Pb
	최종농도	최종농도	최종농도	최종농도
Control	1230	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
PBG 3 D	901.5	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
PBG 7 D	1268	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
control(1)	1181	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
Barley 7 D(1)	1181	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
control(2)	1358	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
Barley 3 D(2)	1073	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
Barley 7 D(2)	1264	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
control	1811	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm
Zymosan 7 D	1450	< 0.3 ppm	< 0.3 ppm	< 0.2 ppm

(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer) 측정 결과. 랫트(Rattus Norvegicus), Control : Control(3차 증류수), PBG : 상황버섯 베타-글루칸 100 mg/kg, Barley : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg, Zymosan : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg. 3 D : 3일간 베타-글루칸 투여, 7 D : 7일간 베타-글루칸 투여.

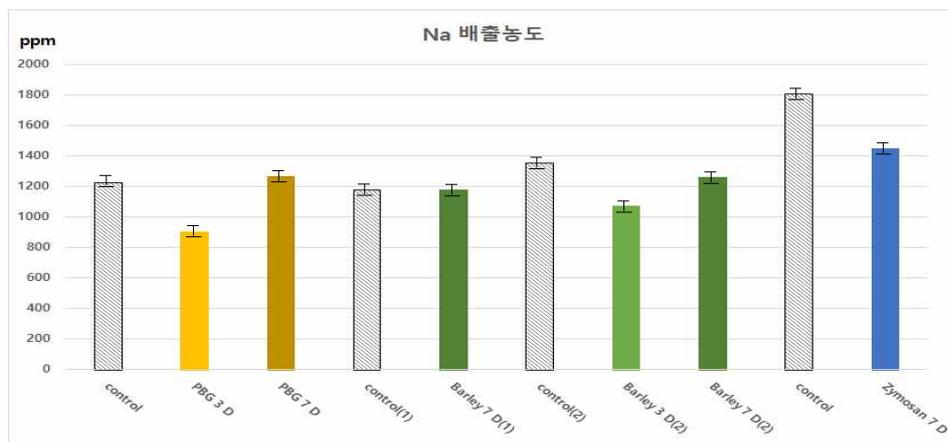


Fig. 3-28. Analysis of rat urine Na⁺ concentration by inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (ICP-AES) after oral administration of beta-glucan(100 mg/kg) for 7 days (n = 3). (Control : Control(3차 증류수), PBG : 상황버섯 베타-글루칸 100 mg/kg, Barley : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg, Zymosan : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg. 3 D : 3일간 베타-글루칸 투여, 7 D : 7일간 베타-글루칸 투여. 상기 시료의 분석을 한국기초과학지원연구원 에서 하였음.)

Control군과 베타-글루칸 투여 군을 비교해보았을 때, 예상은 일주일 동안 베타-글루칸을 경구 투여한 랫트에서 나트륨의 배설 축진이 일어나야 함에도 불구하고, 결과가 오히려 반대로 나온 것은 일반 사료(sodium 1%)로 섭식시켰기 때문에 체내 나트륨 배설 항상성을 유지시켰을거라 추정할 수 있다. 베타-글루칸을 경구 투여하기 전과 일주일 동안 투여하였을 때의 나트륨 배설양이 비슷하며, 3일 째에는 나트륨 배설양이 줄어든 것으로 보아 나트륨 배설양이 증가하였다 감소함을 보임으로써 항상성을 유지시키기 위한 시스템이 발생하였다고 가정할 수 있다. 즉, 일주일 동안 배설된 소변 내 나트륨 양은 비슷하게 진행된다. 따라서 다른 실험 방법을 진행하게 되었다.

(2) 고염분 식이에 의한 소변중의 배출된 나트륨분석

베타-글루칸의 나트륨 배설 축진 실험은 HHS Public Access(*Kidney Int.* 2012 July; 82(q):26-33)의 “Impaired sodium excretion and salt-sensitive hypertension in corin-deficient mice”를 참고하여 진행하였다. Metabolic cage (Fig. 3-29)에 ICR 마우스를 3 마리씩, 고농도 (sodium 10%) 사료를 21일 동안 섭식시키며 매일 몸무게와 사료 섭취량, 식수량을 측정하고 소변을 3차 증류수로 양을 맞추고 4℃에서 보관 후, 분석하였다. 몸무게 및 사료 섭취량, 식수량 측정값은 그림으로 나타내었다 (Fig. 3-30, 3-31, 3-32, 3-33).

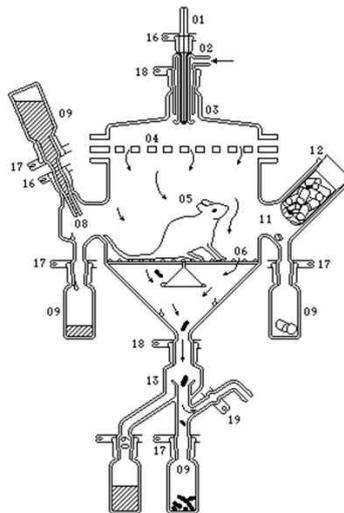


Fig. 3-29. Metabolic cage for collection of urine. (한 cage 당, 2 마리의 마우스를 놓고 Control(3차 증류수), 효모, 보리, 상황버섯의 베타-글루칸 그룹을 분리하여 각 2 cage가 되도록 한다. 식수는 항상 200 ml에 맞추고 고농도(sodium 10%) 사료는 50 g에 맞추어 매일 식수량과 사료 섭취량을 측정한다. 매일 3차 증류수와 베타-글루칸을 100 mg/kg 경구 투여 전에 마우스의 몸무게를 미리 측정한다. ICR

마우스(Mus musculus) n=4)

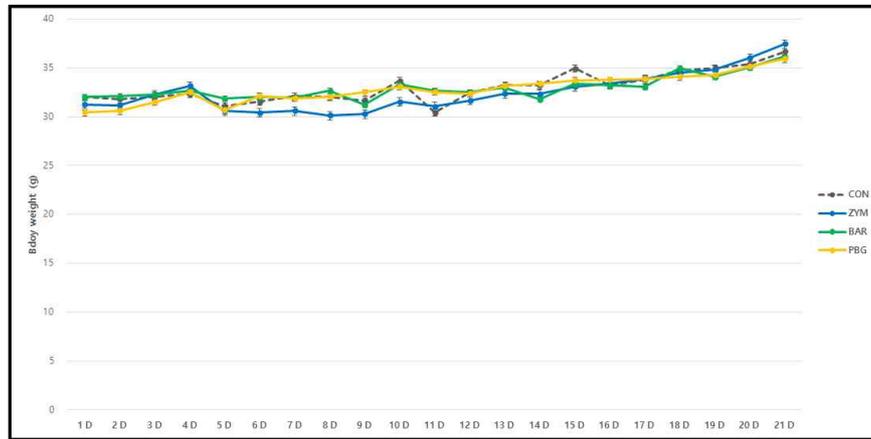


Fig. 3-30. Body weight change during oral administration of beta-glucan in ICR mice for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

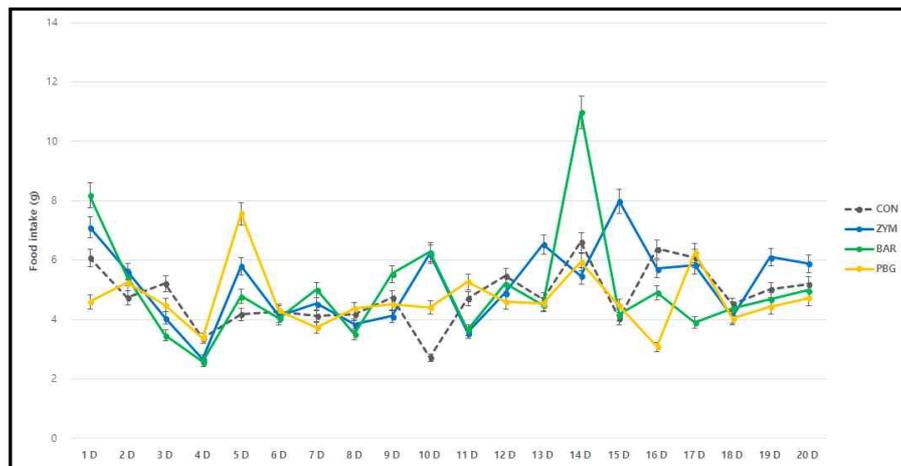


Fig. 3-31. Diet consumption during oral administration of beta-glucan in ICR mice for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

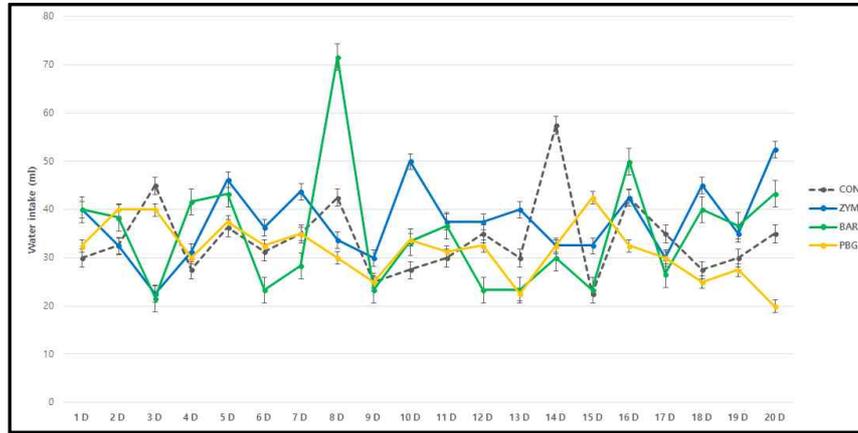


Fig. 3-32. Water consumption during oral administration of beta-glucan in ICR mice for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

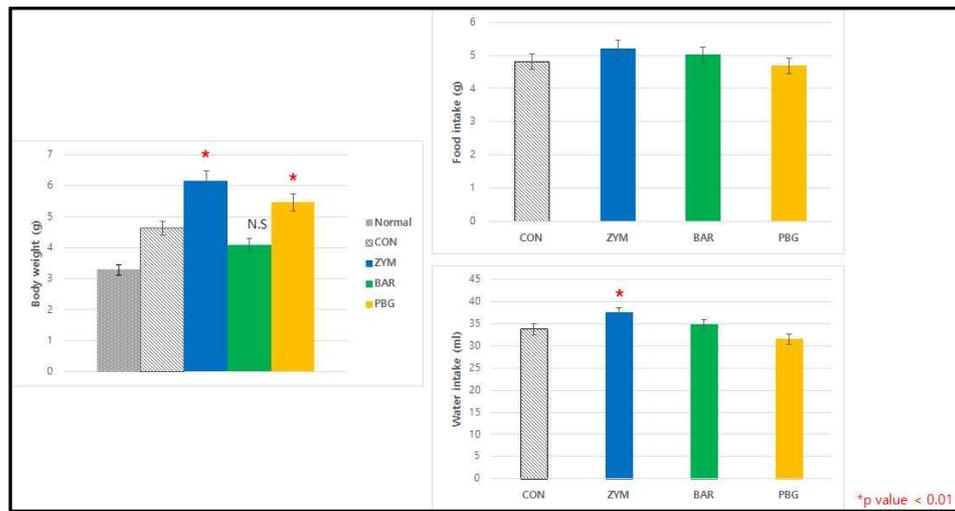


Fig. 3-33. Changes of body weight, diet consumption and water consumption during oral administration of beta-glucan in ICR mice for 21 days (n = 4). (Normal : 3차 증류수에 보통사료 (sodium 1%)를 섭취, CON : 3차 증류수에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

Control과 베타-글루칸 경구 투여를 한 마우스 간에 몸무게, 사료 섭취량, 식수

량은 큰 변화가 없음을 보였다. 이는 베타-글루칸의 경구 투여가 몸무게, 사료 섭취량과 식수량에 큰 변화를 가져오지 않는 것을 의미한다. 약 한달 간의 실험으로 외부기관에 의뢰하기엔 샘플의 양이 증가하여 Sodium assay kit(Bio vision)을 이용하여 직접 실험을 진행하였다.

Sodium assay kit의 Standard curve를 측정하였고 (Fig. 3-34), 이를 토대로 19일간 모아둔 마우스의 소변 샘플에서 나트륨 배설 촉진 여부를 분석하였다 (Fig. 3-35, 3-36, 3-37).

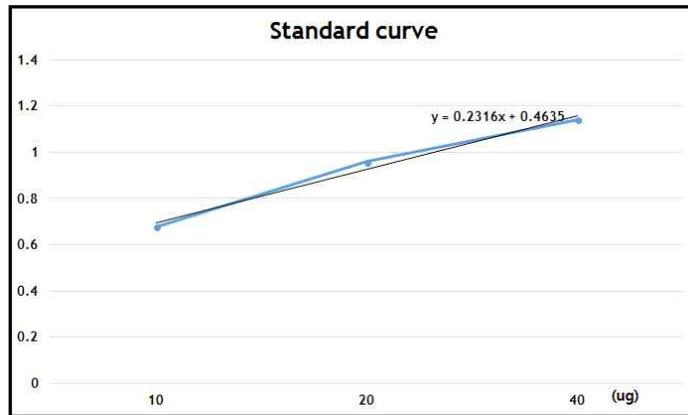


Fig. 3-34. Standard curve of Na⁺ by Sodium assay kit in 96-well plate by microplate reader at 405 nm.

CON	944.9152	
ZYM	1195.066	1.3 배
BAR	1072.494	1.1 배
PBG	1276.728	1.4 배

Fig. 3-35. Na⁺ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.

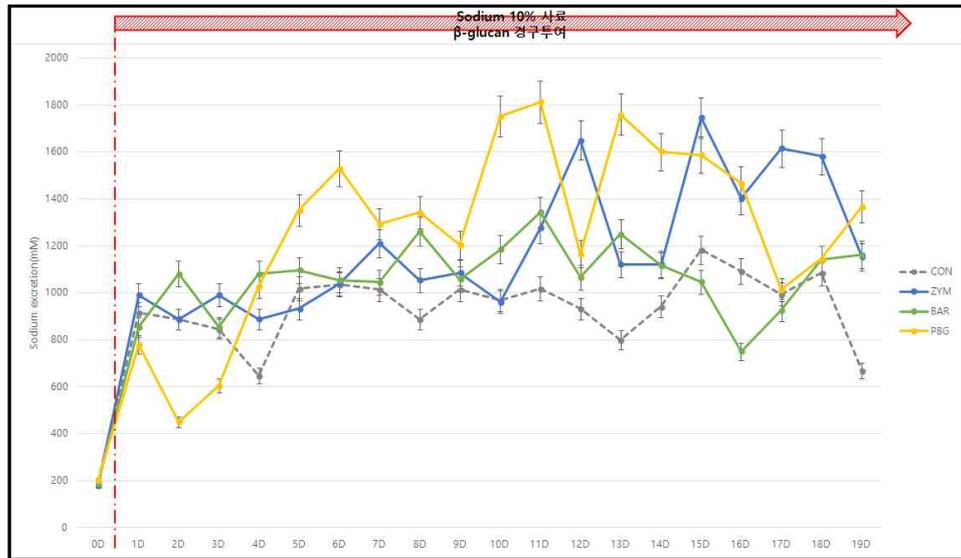


Fig. 3-36. Urine Na⁺ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

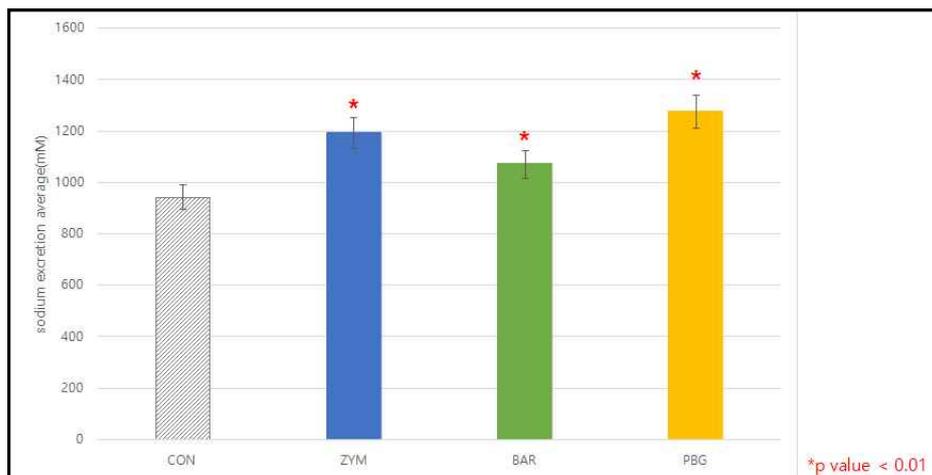


Fig. 3-37. Average Na⁺ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 21 days (n = 4). (CON : 3차 증류수에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM : 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR : 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG : 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

보리 베타-글루칸을 경구 투여한 경우, 효모와 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 것보다 소변 내 나트륨 농도가 떨어짐을 볼 수 있다. 그럼에도 불구하고 Control 군과 비교하였을 때에는 유의미한 값으로 결론을 도출할 수 있다. 즉, 베타-글루칸을 경구 투여한 마우스에서 소변으로의 나트륨 배설이 베타-글루칸을 투여하지 않은 마우스 보다 촉진 되었다는 사실이 된다. 그렇다면, 보통 사료(sodium 1%)를 먹인 마우스에서의 결과는 크게 달라지는 지에 대해 확인해 보기 위해 약 일주일 간 Metabolic cage에서 보통 사료(sodium 1%)로 재 실험을 시행하였다. 그 다음으로 보통사료(sodium 1%)와 고농도(sodium 10%) 사료를 비교한 소변 내 나트륨 농도 변화 값을 분석하였다. 소변중으로 배설되는 나트륨의 농도분석 실험에서 보통(sodium 1%)사료와 고농도(sodium 10%)사료를 비교했을 때, 경향성이 비슷한 결과를 보였다. 보리 베타-글루칸을 경구 투여한 경우, 효모와 상황버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 것보다 소변 내 나트륨 농도가 떨어졌으나 Control 군과 비교하였을 때에는 오차 값이 겹치지 않은 것으로 보아 나트륨을 배출시킨다는 결과 값으로 결론을 도출할 수 있다 (Figs. 3-38, 3-39, 3-40, 3-41). 즉, 사료에 관계없이 베타-글루칸을 경구 투여한 마우스에서 소변으로의 나트륨 배설이 베타-글루칸을 투여하지 않은 마우스 보다 촉진 되었다는 사실이 된다.

CON	296.9249	▲	3 배
CON*	944.9152	▼	
ZYM	567.8463	▲	2 배
ZYM*	1195.066	▼	
BAR	391.3466	▲	2.9 배 *
BAR*	1072.494	▼	
PBG	639.4368	▲	2 배
PBG*	1276.728	▼	

Fig. 3-38. Na⁺ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 21 days (n = 4). (CON : 10 일간 3차 증류수에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, ZYM : 10 일간 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, BAR : 10 일간 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, PBG : 10 일간 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취. CON* : 21일 동안 3차 증류수에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM* : 21일 동안 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR* : 21일 동안 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG* : 21일 동안 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취.)

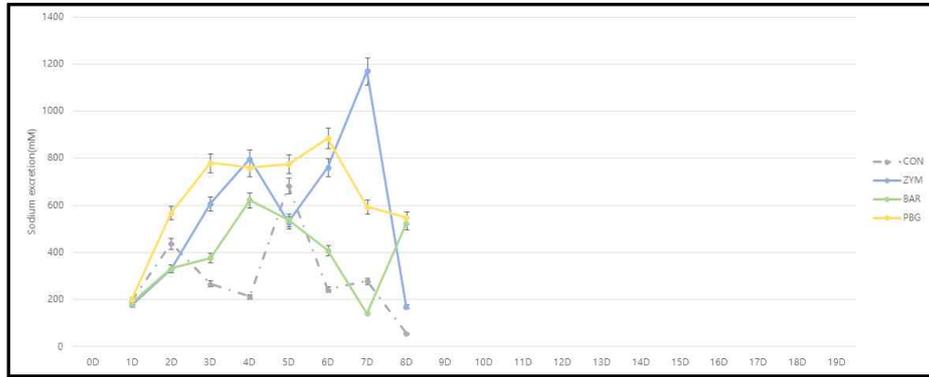


Fig. 3-39. Na^+ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 10 days ($n = 4$). (CON : 10 일간 3차 증류수에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, ZYM : 10 일간 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, BAR : 10 일간 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, PBG : 10 일간 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통 (sodium 1%) 사료 섭취.)

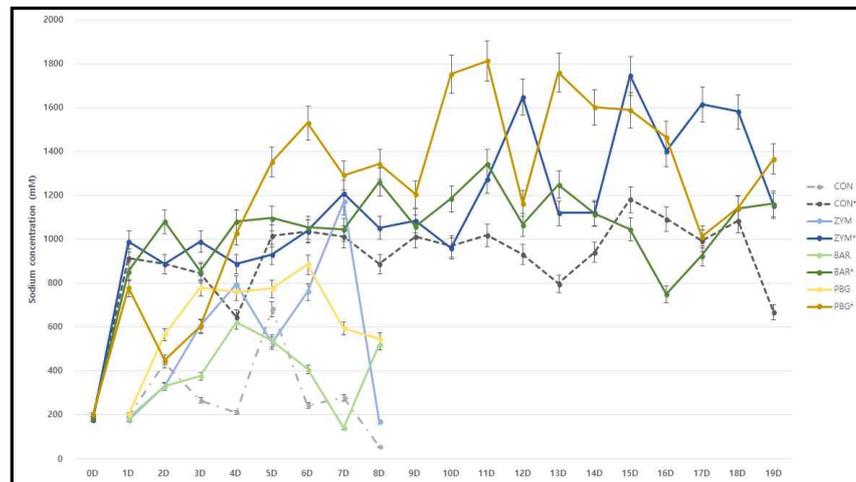


Fig. 3-40. Na^+ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan ($n = 4$). (CON : 10 일간 3차 증류수에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, ZYM : 10 일간 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, BAR : 10 일간 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, PBG : 10 일간 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통 (sodium 1%) 사료 섭취. CON* : 21일 동안 3차 증류수에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취, ZYM* : 21일 동안 효모 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR* : 21일 동안 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, PBG* : 21일 동안 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도 (sodium 10%) 사료 섭취.)

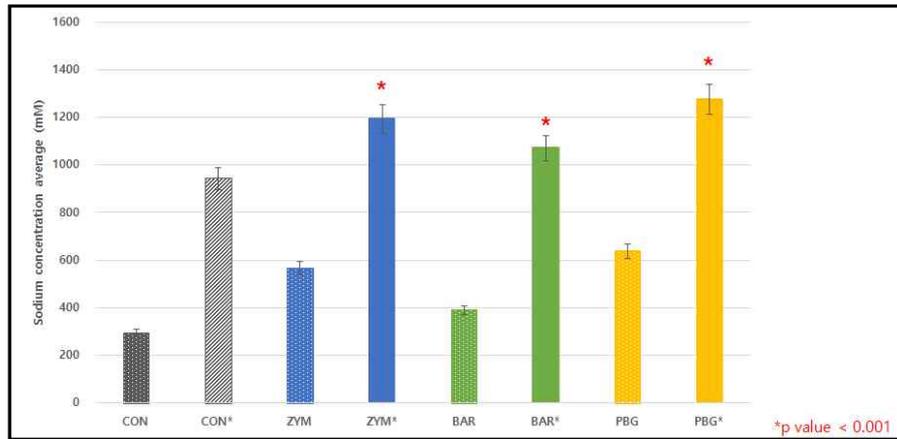


Fig. 3-41. Na⁺ concentration of ICR mouse urine which was administered beta-glucan for 10 days (n = 4). (CON : 10 일 간 3차 증류수에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, ZYM : 10 일간 효 모 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, BAR : 10 일간 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통(sodium 1%) 사료 섭취, PBG : 10 일간 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 보통 (sodium 1%) 사료 섭취. CON* : 21일 동안 3차 증류수에 고 농도(sodium 10%) 사료 섭취, ZYM* : 21일 동안 효모 베타-글루 칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭취, BAR* : 21일 동 안 보리 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농도(sodium 10%) 사료 섭 취, PBG* : 21일 동안 상황버섯의 베타-글루칸 100 mg/kg에 고농 도(sodium 10%) 사료 섭취.)

3. Corin의 연구결론

상황버섯의 베타-글루칸을 경구투여 하였을 때 마우스에서 Corin 유전자와 단백질의 발 현이 증가하였으며, 증가한 Corin은 Pro-ANP를 절단시켜 ANP를 생성하였다. 생성된 ANP는 각각의 수용체에 작용하여 그 효능을 나타낸다. 생성된 ANP가 ANP receptor에 작용하면 고혈압과 심장마비가 예방된다. 혈압이 저하되는 기전은 생성된 ANP가 신장에서 Na의 배설을 촉진시킴으로 가능한데 본 과제에서 Na의 배설이 증진됨을 입증하였다. 또한 생성된 ANP는 wnt receptor에 결합하면 항암작용을 나타낼 수 있다. 이것에 대한 연구는 본 과제의 범위를 벗어나는 것으로써 차후에 다른 과제를 통하여 추구할 예정이 다. 이러한 개념을 정리하여 그림으로 표시하였다 (Fig. 3-42).

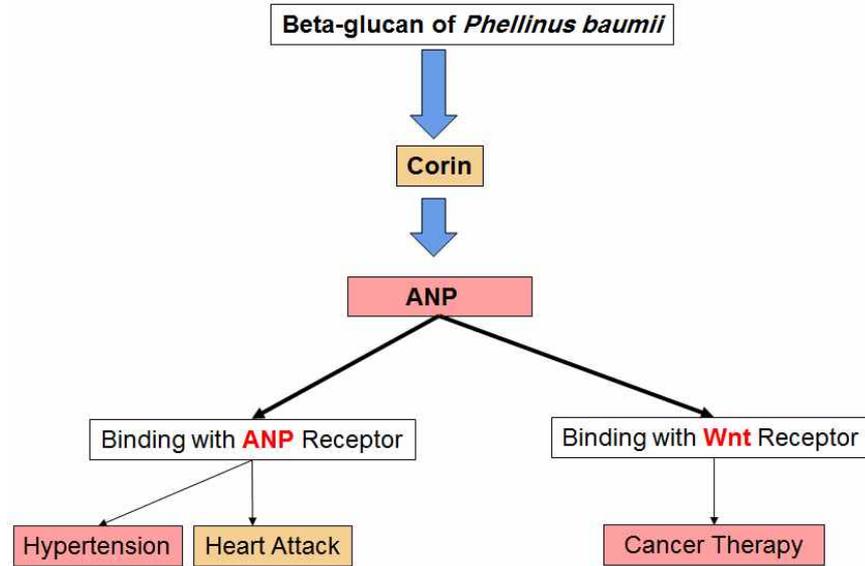


Fig. 3-42. Summary of Corin activities that were increased by the oral administration of beta-glucan from *P. baumii*.

제 3 절 MT 유전자의 발현과 효능

1. 실험적 접근방법

가. Microarray 분석

ICR 마우스의 일주일 안정화 기간 이후, 일주일 간의 상황버섯의 베타-글루칸 (PBE) 100 mg/kg으로 경구 투여하고 sacrifice하여 간 조직을 적출하였다. mRNA를 추출하여 cDNA로 합성하고 microarray 방법을 이용하여 증가하는 유전자와 감소하는 유전자를 분석하였다.

나. 실험동물에서 중금속 배출효능 분석

6주령 된 체중이 20 ± 4 g Balb/c mouse 35마리를 사용하였다 (Pb 15마리, Cd 15마리, Control 5마리). 마우스는 5일간의 환경적응을 시킨 후 주사투여를 시작하였으며 깔집은 3일에 한 번씩 갈아주었다. 사료와 급수는 자유롭게 공급하였으며 mouse의 무게는 실험 시작일로부터 측정하였다. 실험동물은 크게 납 group (PB), 카드뮴 group (Cd), Control로 나뉘었다. 시약은 Lead acetate trihydrate (Sigma, 316512-5G, $C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$ (MW 379.33) light sensitive, air sensitive, 99.999%), Cadmium nitrate tetrahydrate (Sigma, 20911-25G-F, $CdN_2O_6 \cdot 4H_2O$ (MW 308.48, 99.0%이상)를 복강주사 하였으며, PBG(상황버섯 β -glucan)와 ZYM(효모 β -glucan)은 구강주사 하였

다. 납 group은 실험동물을 납만을 단독으로 투여한 Pb group과 Pb와 PBG를 동시 투여한 Pb-PBG group, Pb와 ZYM을 동시 투여한 Pb-ZYM group으로 구분하였다. Pb를 10 mg/kg 농도로 0.2 ml 씩 4일간 복강주사 하였으며 Pb-ZYM과 Pb-PBG group은 복강주사와 동시에 PBG와 ZYM을 100 mg/kg의 농도로 0.1ml씩 7일간 구강주사 하였다. 카드뮴 group은 카드뮴만을 단독으로 투여한 Cd group과 Cd와 PBG를 동시 투여한 Cd-PBG group, Cd와 ZYM을 동시 투여한 Cd-ZYM group으로 구분하였다. Cd를 5 mg/kg 농도로 0.2 ml 씩 4일간 복강주사 하였으며 Cd-ZYM과 Cd-PBG group은 복강주사와 동시에 PBG와 ZYM을 100 mg/kg의 농도로 0.1ml씩 7일간 구강주사 하였다 (Table 3-9). 실험 시작일로부터 14일 째에 sacrifice시켜 mouse의 간, 신장, 비장을 적출하여 70°C 건조기에 24시간 건조시킨 후 ICP-MS로 분석하였다.

Table 3-9. Protocol and grouping for heavy metal clearance after Pb and Cd administration in mice.

Group		Pb(or Cd)	PBG	ZYM
Control				
Pb group	Pb	o		
	Pb-PBG	o	o	
	Pb-ZYM	o		o
Cd group	Cd	o		
	Cd-PBG	o	o	
	Cd-ZYM	o		o

2. 실험결과

가. Microarray 분석을 통한 MT의 발현 규명

PBE를 ICR 수컷 마우스에 1일 또는 7일동안 경구투여한 후, 마우스를 dichloromethane증기를 사용하여 안락사시켰다. microarray 분석을 위하여 간조직에서 총 mRNA를 추출하였다. 간에서 total RNA 추출물을 얻기 위해, 150 mg의 간 조직을 1.5 ml의 RNA 안정화시약(Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 처리하여 유전자 발현 프로파일을 보존했다. 대조군 및 PBE처리한 실험군으로부터 얻은 total RNA를 Mouse Gene 1.0 ST array (Affymetrix Inc., CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 상황버섯의 베타-글루칸 (PBE)을 1회 경구투여 하였을 경우에는 microarray 분석에서 MT1과 MT2 유전자의 발현에 변화가 없었으나 7일간 경구투여하였을 때는 MT1과 MT2의 유전자가 각각 4.6배, 11.3배 증가하였다 (Table 3-10).

Table 3-10. Induction of MT1 and MT2 in mouse liver tissue that was treated with beta-glucan from *P. baumii*.

NO	Gene symbol	Biological process	Average Fold Change	
			SOA	MOA
1	MT1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Remove toxic heavy metal ion ▪ Cellular metal ion homeostasis ▪ Detoxification on copper ion 	1.0	4.6
2	MT2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cellular zinc ion homeostasis ▪ Detoxification of copper ion 	0.9	11.3

나. 마우스 장기에서 MT 유전자의 발현 분석

ICR 마우스에 베타-글루칸을 7일간 경구투여 하였을 때 간과 신장에서 발현되는 MT 유전자의 발현을 realtime PCR로 분석하였을 때 간에서는 크게 증가하였으나, 신장에서는 보리 베타-글루칸 투여군을 제외하고는 큰 변화가 없었다 (Fig. 3-43).

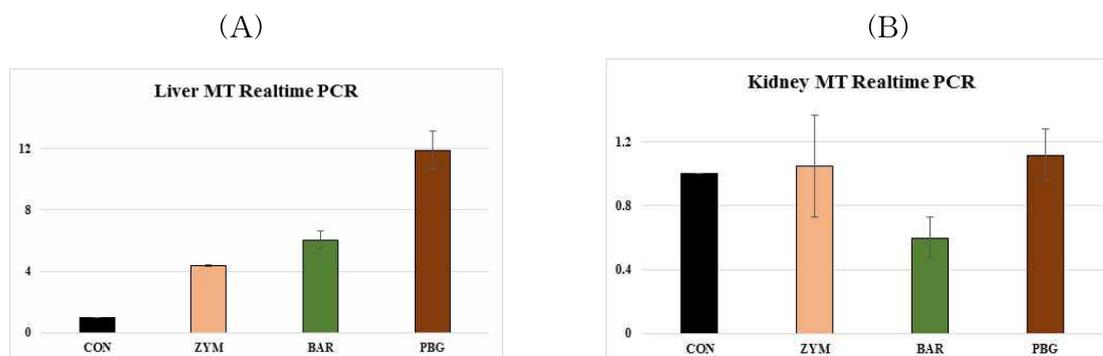


Fig. 3-43. Expression of MT mRNA in liver (pannel A) and kidney (pannel B) by real time PCR analysis. CON: Control; ZYM: Zymosan; BAR: Beta glucan from Barley; PBG: *Phellinus baumii* beta glucan. Analyzed by AmpGene qPCR Green Mix Hi-Rox(Enzo), ABI-7000. Polymerase activation 2 min, 95°C, 1 cycle, Denaturation 5 sec, 95 °C, Annealing/Extension 30 sec, 65 °C, 40 cylces. 18s rRNA Forward : ACC GCA GCT AGG AAT AAT GGA ATA, Reverse : CTT TCG CTC TGG TCC GTC TT, MT Forward : CTG TGC CTG AAG TGA CGA AC, Reverse : CAC ATG CTC GGT AGA AAA CGG.

다. 장기에서 잔류 중금속의 분석

Pb의 control group에는 Pb를 10 mg/kg 농도로 0.2 ml 씩 4일간 복강주사 하였으며, Pb-ZYM과 Pb-PBG group은 복강주사와 동시에 PBG와 ZYM을 100 mg/kg의 농도로 0.1ml씩 7일간 구강주사 하였다. 카드뮴 group은 카드뮴만을 단독으로 투여한 Cd group과 Cd와 PBG를 동시 투여한 Cd-PBG group, Cd와 ZYM을 동시 투여한 Cd-ZYM group으로 구분하였다. Cd를 5 mg/kg 농도로 0.2 ml 씩 4일간 복강주사 하였으며 Cd-ZYM과 Cd-PBG group은 복강주사와 동시에 PBG와 ZYM을 100 mg/kg의 농도로 0.1ml씩 7일간 구강주사 하였다. 실험 시작일로부터 14일 째에 sacrifice시켜 mouse의 간, 신장, 비장을 적출하여 70℃ 건조기에 24시간 건조시킨 후 ICP-MS로 분석하였다.

그 결과 잔류 Pb의 농도는 spleen에서 가장 낮은 농도로 나타났으며, PBG보다 zymosan group에서 더 큰 효과를 나타내었다. 신장에서 Pb의 배설은 spleen보다는 미약하였으며, 이경우에도 zymosan의 효과가 PBG보다 강하게 Pb를 배설하였다 (Fig. 3-44). 한편 Cd의 배설은 모든 장기에서 Pb배설보다 미약하였다. 베타-글루칸은 spleen과 kidney에서 중금속배설을 촉진하였다. Cd의 배설실험에서는 zymosan보다는 PBG의 효과가 더 높았으며, Cd의 배설촉진효과가 높았다 (Fig. 3-45). 이러한 결과로 미루어 실험에 사용된 베타-글루칸은 Pb 또는 Cd 등의 중금속 배설을 촉진하였으며, 이러한 중금속배설 증가효능은 투여한 베타-글루칸에 의하여 증가된 MT 유전자에 기인하는 것으로 사료된다.

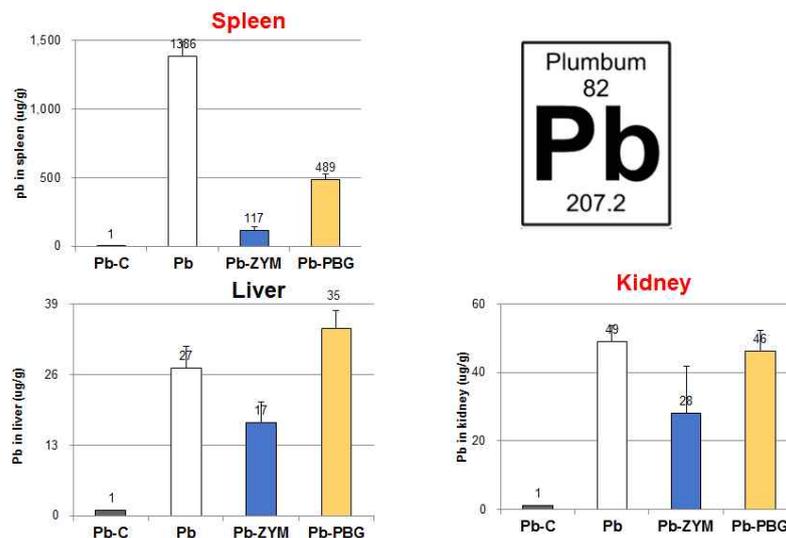


Fig. 3-44. Residual concentrations of Pb in liver /kidney /spleen, liver and kidney in mice that was treated with beta-glucan from *P. baumii*.

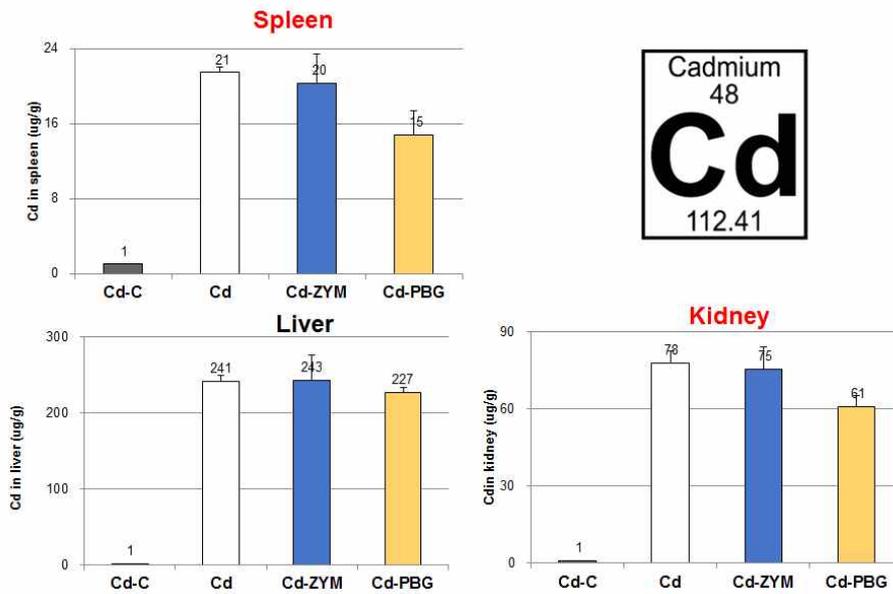


Fig. 3-45. Residual concentrations of Cd in spleen, liver and kidney in mice that was treated with beta-glucan from *P. baumii*.

3. Metallothionein 발현실험의 결론

본 과제를 통하여 밝혀낸 사실은 상황버섯의 베타-글루칸을 경구투여하여 각종 유전자가 유의성있게 증가하였으며, 그 중에서도 FMO계열의 유전자, corin 유전자, 그리고 metallothionein (MT) 유전자의 발현이 크게 증가함을 밝혀내었다. 이러한 유전자의 발현 증가는 상황버섯의 베타-글루칸에만 의존하는 것이 아니라 효모 또는 보리의 베타-글루칸에 의해서도 일어남을 밝혀내었다. 마이크로어레이에 의하여 증가된 FMO계열의 유전자, corin 유전자, 그리고 metallothionein (MT) 유전자의 발현증가는 realtime PCR로도 증명하였으며, 증가된 유전자에 의한 생물학적 작용을 실험동물에서도 입증하였다. 지금까지 베타-글루칸은 분자량이 커서 경구투여로는 흡수가 되지 않을 것이라고 생각하였으나 본 실험에서는 모든 실험에서 경구투여한 베타-글루칸이 유전자의 발현을 촉진시켰을 뿐만 아니라 실험동물에서 그 효능까지 잘 나타내었다. 따라서 본 연구과제를 통하여 경구투여한 베타-글루칸은 소장에서 흡수가 잘 되었으며, 실험동물에서도 효과가 입증된 것이 큰 업적이라고 할 수 있다. 이러한 연구결과에 대한 내용을 그림으로 요약하였다 (Fig. 3-46).

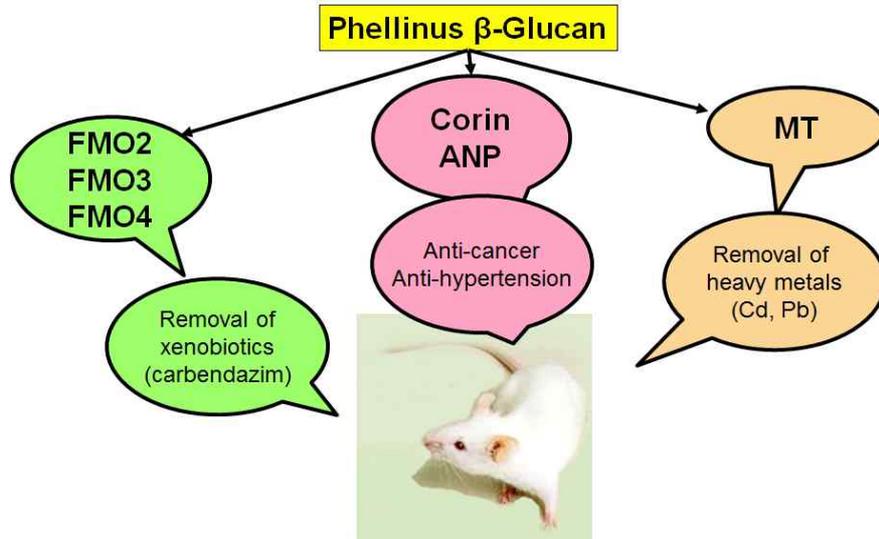


Fig. 3-46. Conclusion and summary of biological function by Phellinus beta-glucan in mice.

제 4 절 연구개발 성과

1. 논문게재 성과

[논문-1]

항목	내용	비고
게재연도	2016	
논문명	Induction of Flavin-containing Monooxygenase in Mice by Oral Administration of <i>Phellinus baumii</i> (Agaricomycetes) Extract	
저자명	Batbayar Sainkhuu, Beom Su Park, Ha Won Kim	
학술지명	International Journal of Medicinal Mushrooms	IJMM
Vol.(No.)	18(9)	
국내외 구분	국외 (미국)	
SCI구분	SCIE	
기타	페이지: 793-806	

[논문-2]

항목	내 용	비고
계재연도	2017	
논문명	Activation of NADPH Oxidase by Beta-Glucan of <i>Phellinus baumii</i> Pilat (Hymenochaetaceae, Higher Basidiomycetes) in RAW264.7 Cells	
저자명	Soo Kyung Sung, Sainkhuu Batbayar, Dong Hee Lee and Ha Won Kim	
학술지명	International Journal of Medicinal Mushrooms (IJMM)	
Vol.(No.)	19(11)	인쇄중 (계재 확정)
국내외 구분	국외 (미국)	
SCI구분	SCIE	
기타		

2. 국내 및 국제학술회의 발표성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	코드번호	C-06-02
				장소	국명
1	2014 Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology	김하원, 박범수	2014. 10. 31	서울대학교 호암교수회관	대한민국
2	The 8th International Medicinal Mushroom Conference(IMMC8)	김하원, 박범수	2015. 08. 25	콜롬비아 마니잘레스	콜롬비아
3	2015 Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology	박범수, Batbayar Sainkhuu, 김하원	2015. 10. 08	서울대학교 호암교수회관	대한민국
4	2016 Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology	김하원, 윤수경, 이동희	2016. 10. 07	숙명여자대학교 삼성컨벤션센터	대한민국
5	2017 Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	김하원, 성수경, Batbayar Sainkhuu, 이동희	2017. 04. 20	충청북도 C&V 센터	대한민국
6	The 9 th International Medicinal Mushrooms Conference	이선정, 이동희, 김하원	2017. 09. 26	이태리 팔레르모	이탈리아

3. 특허 성과 (출원된 특허 및 등록된 특허를 모두 기재)

* 출원: 출원연도, 특허명, 출원인, 출원국, 등록·기탁번호 / 등록: 등록연도, 특허명, 등록인, 등록

[국내특허 출원-1]

항목	내 용	비고
출원연도	2015	
특허명 (발명의 명칭)	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 N-, S-, P- 함유 생체외래물질 분해 촉진용 조성물	
출원인	서울시립대학교 산학협력단	
출원국	대한민국	
출원번호	10-2015-0046872 (2015.04.02)	
발명자	김하원	
기타		

[국내특허 출원-2]

항목	내 용	비고
출원연도	2015	
특허명 (발명의 명칭)	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 약취 저감용 조성물	
출원인	서울시립대학교 산학협력단	
출원국	대한민국	
출원번호	10-2015-0046873 (2015.04.02)	
발명자	김하원	
기타		

[국제특허 출원-3]

항목	내 용	비고
출원연도	2015	
특허명 (발명의 명칭)	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 N-, S-, P- 함유 생체의외래물질 분해 촉진용 조성물	
출원인	서울시립대학교 산학협력단	
출원국	대한민국	
출원번호	PCT/KR2015/008056 (출원일 : 2015. 07. 31)	
발명자	김하원	
기타		

[국제특허 출원-4]

항목	내 용	비고
출원연도	2015	
특허명 (발명의 명칭)	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 약취 저감용 조성물	
출원인	서울시립대학교 산학협력단	
출원국	대한민국	
출원번호	PCT/KR2015/008057 (출원일 : 2015. 07. 31)	
발명자	김하원	
기타		

제 5 절 연구결과

1. 기술적 성과

가. FMO 유전자의 발현과 효능

(1) 기술개발 의의: 상황버섯 또는 베타-글루칸에 의한 FMO 유전자의 발현에 관한 연구는 전세계적으로 전무하며, 오직 본 연구자가 본 과제를 통하여 성취한 FMO에 관하여 보고한 연구결과 (Int. J. Med. Mushrooms 2016;18(9):793-806)만 있을 뿐이다. 본 연구자의 연구결과에 의하면 국내에서 다량 재배되는 *Phellinus baumii*

상황버섯 자실체의 총추출물 또는 이 버섯에서 추출한 베타-글루칸 분획이 마우스의 간에서 Flavin-Containing Monooxygenase(FMO)를 증가시킴을 마이크로어레이 방법으로 발견하였으며, 리얼타임 PCR로 증명하였을 뿐만 아니라 마우스에 투여한 농약의 일종인 carbendazim의 혈중배설을 촉진시킨다는 것을 실험으로 증명하였다. 뿐만 아니라 상황버섯의 베타-글루칸은 마우스 소변중의 악취물질인 trimethylamine (TMA)을 증가된 FMO효소에 의하여 무취물질인 trimethylamine N-oxide (TMAO)로 신속히 분해함을 실험으로 증명하였다.

(2) 우선권 확보: 본 연구과제를 통하여 상황버섯의 총추출물 또는 이 버섯에서 추출한 베타-글루칸 분획이 마우스의 간에서 Flavin-Containing Monooxygenase(FMO)를 증가시킴을 세계 최초로 발견하였으므로 특허 (국내출원 2건, PCT 국제특허 출원 2건)를 출원하여 국내특허는 현재 심사중에 있으며, SCIE에 해당하는 국제저널 (Int. J. Med. Mushrooms 2016;18(9):793-806)에도 투고하여 2016년에 발행된 바가 있다.

(3) 베타-글루칸의 소변악취 저감기술의 상품가치

(가) 본 기술의 차별성: 상황버섯이 동물의 간에서 FMO 유전자 발현을 10배 이상 증가시키는 기술은 아래와 같은 차별성과 장점을 가지고 있다.

- ① 무독성: 본 기술은 체내 FMO 유전자를 증가시키며, 무독성이며 안전한 성분임.
- ② 사료첨가제: 본 기술은 경구로 투여하여도 작용하므로 사료에 첨가하기만 하면 효력이 발생함.
- ③ 원가절감법: 상황버섯이 고가인 단점을 해결하기 위하여 효모 또는 식물 등에서도 추출하여 원가절감을 달성하였음.
- ④ 국내외 특허 출원: 본 기술은 세계 최초로 발견하여 동물실험이 완료되었으며, 국내특허 출원 뿐만 아니라, 국제특허 PCT도 출원하여 우선권을 확보하고 있으므로 즉시 상품화가 가능함.
- ⑤ 소변악취 제거: 기존 타사료 제품은 변냄새 제거에 초점을 맞추고 있지만, 본 기술은 소변냄새를 특징적으로 제거함.

- 애완동물 악취는 쾌적환경을 방해
- 축산악취는 지자체의 큰 골칫거리
- 축산악취로 온 도시가 밤잠을 못잠
- 국내외 사료시장 규모와 성장은 상상을 초월하는 속도로 성장

사료첨가물에 의한 악취저감기술

- 1) 세계 최초로 FMO를 기반으로 하는 기술발견
- 2) 사료 역사상 최초로 악취 저감성분 발견
- 3) 과학적이고 근본적 악취 저감제임
- 4) 무독성 안전성분으로 부작용 없음

그림: 사료 역사상 최초로 악취저감 사료첨가물을 개발한 본 기술의 장점.

(나) 본 기술의 활용(적용) 분야: 본 기술은 동물소변중의 악취성분을 사료에 첨가함으로써 저감시킬 수 있기 때문에 아래 분야에 적용가능하다.

- ① 애완동물 소변악취 제거제: 애완견, 고양이 등
- ② 축산동물 소변악취 제거제: 돼지, 한우, 닭, 오리 사육장
- ③ 체내 잔류농약 제거 (채소, 과일, 채식주의자 등)
- ④ 농약중독 제거제 (농약자살 후유증 신속 회복)
- ⑤ 체초제 중독 회복제 (군부대, 농민 등)
- ⑥ 체내 니코틴 제거제 (여성 흡연자 및 임신중 흡연자 니코틴 배설제)
- ⑦ 부작용: 과량 복용하여도 부작용이 전혀 없음

나. Corin의 유전자 발현과 효능

(1) 기술개발 의의

상황버섯 추출물 또는 상황버섯의 베타-글루칸을 동물에 경구투여 하였을 때 동물의 간에서 corin 유전자의 발현이 크게 증가함을 마이크로어레이법으로 발견하였으며, 증가한 것을 리얼타임 PCR로도 증명하였다. 동물에서 corin 단백질 효소의 발현이 증가하면 증가된 corin효소는 pro-ANP를 활성형의 ANP로 생산시켜 항암작용을 나타낸다. 항암작용을 나타내는 기전은 증가된 ANP가 암세포의 Wnt와 경쟁적으로 Frizzled receptor에 결합함으로써 Wnt의 결합을 억제하여 항암작용을 발휘한다. ANP에 의한 이러한 항암작용은 매우 강하여 “항암요법을 위한 마법의 총알 (Atrial natriuretic peptide: a magic bullet for cancer therapy targeting Wnt signaling and cellular pH regulators, Curr Med Chem. 2014;21(21):2401-9)”이라고도 표현할 정도이다.

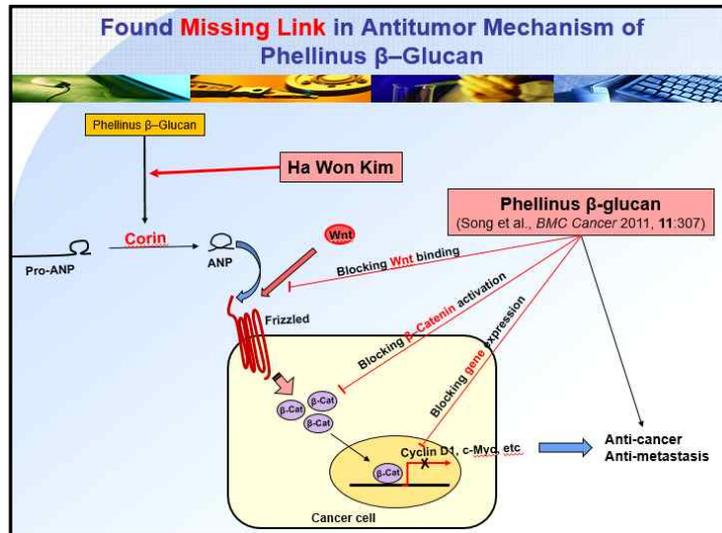


Fig.: Novel antitumor mechanism of corin induced in animal liver tissue by oral administration of beta-glucan of *Phellinus baumii*, which was presented at the IMMC9 conference on September 2017 in Italy.(본 연구자가 2017년 9월에 이태리에서 개최된 제9회 국제약용버섯학회에서 구두발표한 자료중의 일부).

(2) Corin 발현촉진 기술의 가치

(가) 신규 항암기전: 상황버섯의 베타-글루칸이 동물의 간에서 corin의 발현을 촉진시키는 기술은 베타-글루칸의 항암작용 기전을 설명하는 또 다른 기전이 된다. 지금까지 상황버섯 베타-글루칸의 항암작용은 면역을 촉진하여 항암작용을 나타낸다고 보고되어왔으나, 본 과제를 통하여 상황버섯 베타-글루칸의 항암작용은 corin의 증가에 의하여 생성된 활성형의 ANP가 항암작용에 관여한다는 것을 세계 최초로 발견한 것이다. 이 기술은 버섯의 베타-글루칸의 항암작용에 관한 새로운 지견을 제공하는 것으로써 베타-글루칸의 우수한 항암작용을 새로운 시각을 제공하게 되는 것이다. 이로써 국내에서 다량으로 재배하고 있는 *Phellinus baumii* 상황버섯의 부가가치를 높이는 계기가 될 수 있을 것이며 농가의 소득향상에 크게 이바지 할 것으로 예상된다.

(나) 혈압저하 기전: 본 과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸이 실험동물에서 corin 발현을 증가시키고 이로 인하여 활성형의 ANP가 생성됨을 발견하였다. 생성된 ANP는 항암작용 뿐만 아니라 신장을 통하여 나트륨의 배설을 촉진시킴을 증명하였다. 이러한 기술은 베타-글루칸의 혈압저하 기전을 세계 최초로 증명한 것이다. 지금까지는 베타-글루칸이 혈압저하 작용을 나타낸다고만 보고되었으며, 그 기전에 대하여는 보고된 바가 없다. 본 과제를 통하여 버섯의 베타-글루칸에 의한 혈압저하기전은 ANP를 통하여 일어남을 밝힌 획기적인 기술이다.

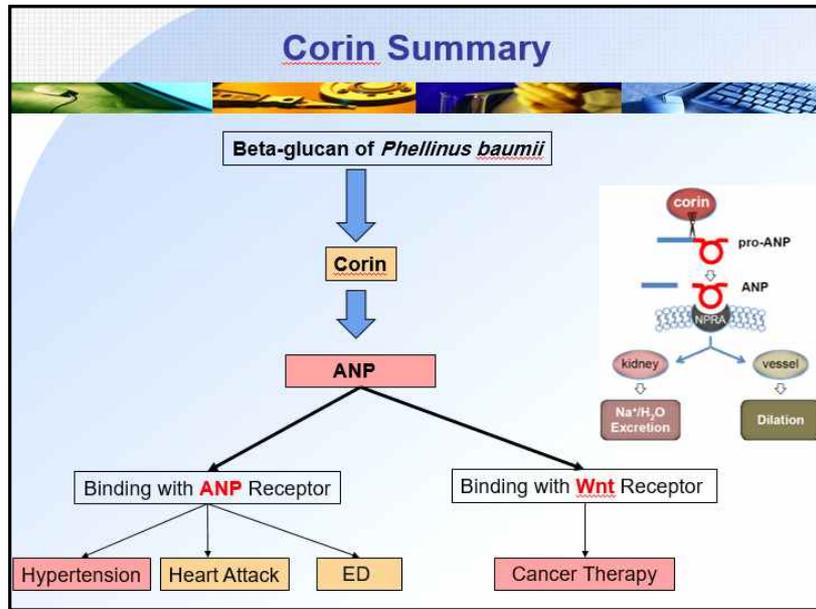


Fig.: Mechanisms of anti-hypertension, prevention of heart attack and erectile dysfunction and antitumor by the ANP which is produced by corin. (본 연구자가 2017년 9월에 이태리에서 개최된 제9회 국제약용버섯학회에서 구두발표한 자료중의 일부).

다. MT 유전자의 발현과 효능

본 과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸에 의하여 마우스의 간에서 metallothionein (MT) 유전자의 발현이 증가하였으며, 증가된 MT 유전자에 의하여 체내의 중금속 배출이 촉진됨을 발견하였다. 최근에는 각종 농작물을 통하여 중금속의 섭취가 증가하고 있는 현실이다. 이러한 때에 본 기술은 상황버섯의 소비를 촉진시키는 귀한 과학적 자료가 될 수 있을 것이다.

2. 경제적 성과

가. 본 기술의 시장성: 상황버섯의 베타-글루칸에 의한 동물 소변의 악취를 저감시키는 본 기술은 사료첨가제로 사용하면 동물 소변의 악취를 획기적으로 저감시킬 수 있다. 특히 애완동물의 소변 악취는 각 가정에서 절실한 문제가 되어왔다. 본 과제의 악취저감기술은 애완동물 뿐만 아니라 축산업의 악취저감에도 큰 기여를 할 수 있을 것이다. 본 기술이 시장진출을 위하여 아래와 같이 국내외 여건이 이미 성숙되어있다.

- (1) 핵가족시대와 원룸시대에 애완동물 사육 가정이 급증.
- (2) 식품첨가제이므로 수요는 무한적으로 창출 가능함.
- (3) 생활수준 향상으로 친환경제품이 인기높음.
- (4) 국내 반려동물산업 규모: 2010년(1조원), 2013년(1.8조원), 2020년(6조원)으로 시장 규모가 크며, 대형마트(이마트)의 2012년 애완동물 사료 매출비율은 수입품(64%), 국내산(36%)이며 아직 국내사료시장도 높은 편임.(자료출처: 한국경제 2013. 7. 8

애견사료 시장 기사)

(5) 애완동물 사료시장규모: 2012년 수입사료 (870억원)와 국산사료(630억원)를 합치면 1,500억원 규모임.(자료출처: 데일리벳 2014. 5. 4 인터넷신문)

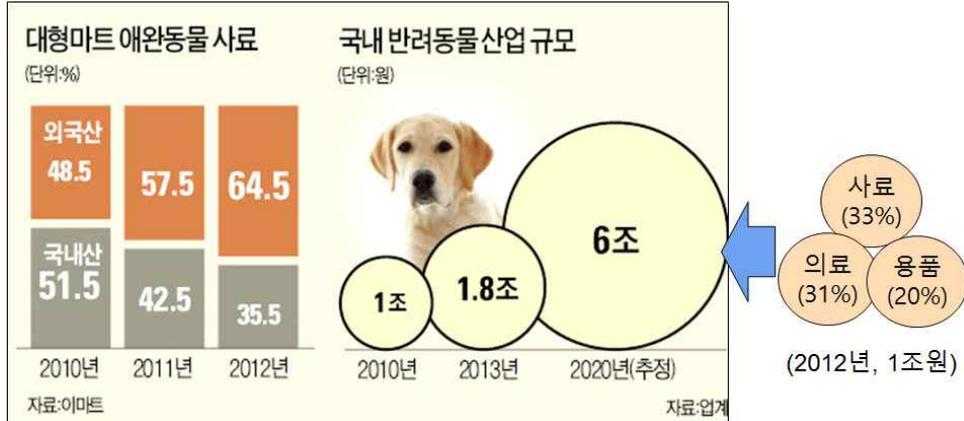


그림: 국내 반려동물 산업 규모는 2012년에 1조원에 상당하며, 대형마트에서 애완동물의 사료시장은 국내산과 외국산의 규모가 모두 증가세에 있다.

나. 국내 반려동물 시장 규모: 국내외 사료시장의 규모는 매년 급증추세에 있으며 2016년도의 국내사료시장 규모는 6,300억원이며, 2017년에는 8,000억원으로 추정하고 있다 (아래 그림 참고).

- (1) 수입현황: 네슬레퓨리나와 한국마스 등이 국내 시장의 70% 이상을 점유
- (2) 국산사료: 대한사료, 대주사료, CJ, 우성 등 국내 업체들도 중저가 위주의 반려동물 사료 생산
- (3) 국내 대기업도 시장참여 개시
 - (가) CJ제일제당: ‘오프레시’와 ‘오네이처’ 등 반려견 사료로 100억원 매출 (2014년). 오프레시를 300억원대 브랜드로 성장목표.
 - (나) 동원F&B: 고양이용 습식사료 ‘뉴트리플렌’을 출시, 반려견용 사료는 준비중.
 - (다) 롯데: 합작법인 롯데네슬레코리아를 만들어 반려동물 사료 ‘퓨리나’ 판매중
 - (라) 사조산업: 고양이 습식사료 ‘사조 로하이 캣푸드’ 6종을 생산
 - (마) 이마트: 자체 브랜드 사료 ‘엠엠도그’를 판매중.
 - (바) 대산물산ANF: 반려견용 유기농 제품군 생산

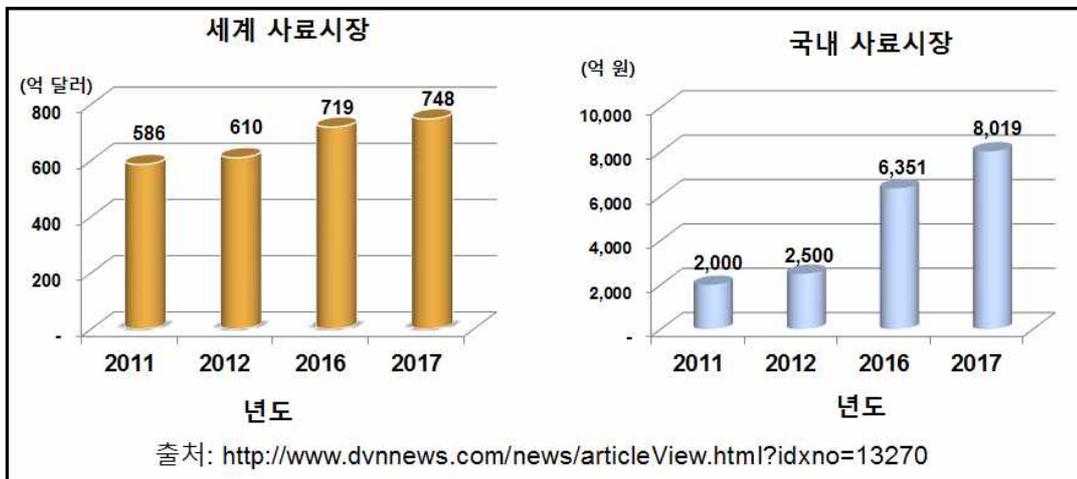


그림: 국내 반려동물 산업 규모는 증가추세에 있으며, 특히 국내사료시장의 규모는 최근에 급증하는 추세이다.

다. 기술이전을 위한 본 연구자의 노력: 본 연구자는 본 과제를 통하여 개발한 동물소변 약취제거기술을 기업에 이전하기 위하여 다각도로 노력하고 있으며, 그 중의 일부를 아래 그림으로 나타내었다.

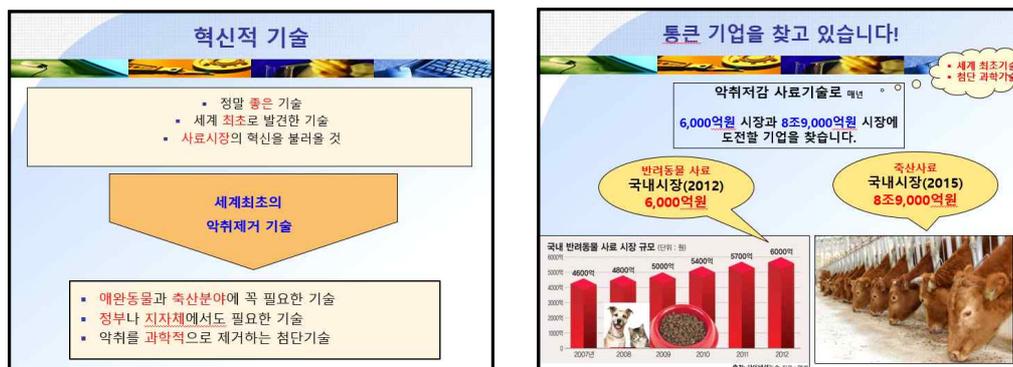


그림: 본 과제를 통하여 개발한 상황버섯 추출물의 경구투여에 의한 동물의 약취를 저감시킬 수 있는 기술이전을 위한 발표자료중의 일부.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

코드번호 D-06

제 1 절 연구목표 및 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2015)	FMO 유전자의 발현과 효능	마이크로어레이를 통한 FMO1 ~ FMO5의 발현 연구	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여후 간조직의 FMO 등 마이크로어레이 분석 실시 	100% 달성
		상항버섯의 베타-글루칸을 경구 투여 후 동물의 간, 폐, 신장에서 FMO1 ~ FMO5 유전자의 발현 연구	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여후 각종 장기중의 FMO 유전자발현 분석 실시 	100% 달성
		동물에서 니코틴, 농약, 소변중 약취성분 등의 배설촉진 규명	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여후 소변중의 약취성분을 GC로 분석 	100% 달성
2차 년도 (2016)	Corin 유전자의 발현과 효능	마이크로어레이를 통한 Corin의 발현 연구	<ul style="list-style-type: none"> 마이크로어레이 분석 방법을 통해 mouse에서의 corin 발현을 분석함 	100% 달성
		Macrophage cell line을 사용하여 세포내에서 Corin 유전자의 발현분석	<ul style="list-style-type: none"> 세포주를 이용하여 Corin을 RT-PCR로 분석함 	100% 달성
		간에서 Corin 유전자 및 단백질 발현 증가 분석	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여후 Corin을 RT-PCR과 western blot로 분석함 	100% 달성
		마우스에서 나트륨 배설 촉진	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여 후 소변 중 나트륨 배설량을 분석함. 	100% 달성
		니코틴 배설 촉진 분석	<ul style="list-style-type: none"> 마우스에 베타글루칸을 경구투여후 혈액 중 니코틴 잔존량을 GC로 분석함. 	100% 달성
3차 년도 (2017)	MT유전 자의 발현과 효능	마이크로어레이 분석을 통한 MT의 발현 규명	<ul style="list-style-type: none"> 상항버섯을 일주일간 투여후 마이크로어레이 분석을 통한 MT의 발현 증가 규명 	100% 달성
		마우스의 장기에서 MT 유전자의 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> 상항버섯의 베타-글루칸을 경구 투여한 mouse의 조직에서의 MT 유전자 발현 증가를 rt-PCR을 통해 규명 	100% 달성
		실험동물에서 중금속 배출효능 분석	<ul style="list-style-type: none"> 카드뮴을 투여 후 혈중 카드뮴과 납 분석을 원자흡광광도법으로 측정 	100% 달성

제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도

1. 상황버섯에 의한 flavin-containing monooxygenase (FMO) 발현촉진 기술

상황버섯의 베타-글루칸을 실험동물에 경구투여하였을 경우에 FMO유전자의 발현이 크게 증가하였다. 그중에서도 FMO3의 발현이 크게 증가함을 나타내었으며 농약을 투여하였을 때 신속히 분해제거시킴을 증명하였다. FMO 발현촉진 기술은 소변중의 악취성분인 trimethylamine (TMA)의 분해도 촉진시켜서 무취성분인 TMAO로 배설시키므로 다음과 같은 산업분야에 기여하게 될 것이다.

가. 애완동물 소변악취 제거제: 애완견, 고양이 등

나. 축사동물 소변악취 제거제: 돼지, 한우, 닭, 오리 사육장

다. 체내 잔류농약 제거 (채소, 과일, 채식주의자 등)

라. 농약중독 제거제 (농약자살 후유증 신속 회복)

마. 제초제 중독 회복제 (군부대, 농민 등)

바. 체내 니코틴 제거제 (여성 흡연자 및 임신중 흡연자 니코틴 배설제)

(참고: 상황버섯의 베타-글루칸은 과량 복용하여도 부작용이 전혀 없음)

2. 상황버섯에 의한 Corin 발현촉진 기술

가. 항암기전: 지금까지 상황버섯 베타-글루칸의 항암작용은 면역을 촉진하여 항암작용을 나타낸다고 보고되어왔으나, 본 과제를 통하여 상황버섯 베타-글루칸의 항암작용은 corin의 증가에 의하여 생성된 ANP가 항암작용에 관여한다는 것을 세계 최초로 발견하였다. 이 기술은 버섯의 베타-글루칸의 항암작용에 관한 새로운 지견을 제공하게 된다. 또한 국내에서 다량으로 재배하고 있는 *Phellinus baumii* 상황버섯의 부가가치를 높이는 계기가 될 수 있을 것이며 농가의 소득향상에 크게 이바지 할 것으로 예상된다.

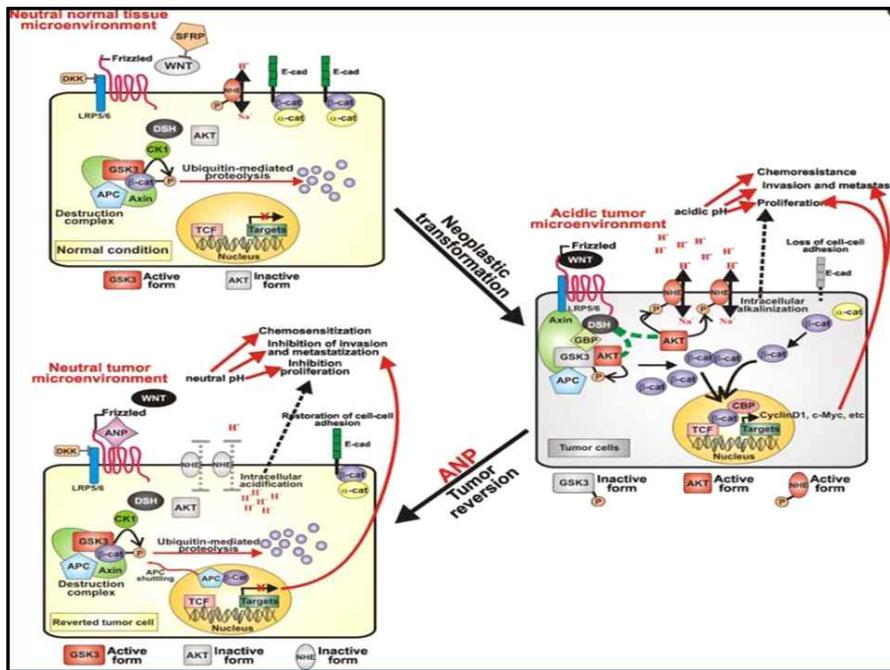


그림: 체내에서 ANP가 증가하면 암세포 주변의 산성화가 감소될 뿐만 아니라 Wnt의 신호도 차단되어 항암작용이 획기적으로 발현된다는 기전을 나타내는 그림. 본 과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸에 의하여 corin의 발현이 증가하며 이로인하여 ANP가 생성되어 항암작용을 나타내는 기전을 보여주는 것이다 (출처: Curr Med Chem. 2014;21(21):2401-2409).

나. 혈압저하 기전: 본 과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸이 실험동물에서 corin 발현을 증가시키고 이로 인하여 활성형의 ANP가 생성됨을 발견하였다. 생성된 ANP는 항암작용 뿐만 아니라 신장을 통하여 나트륨의 배설을 촉진시킴을 증명하였다. 본 과제를 통하여 버섯의 베타-글루칸에 의한 혈압저하기전은 ANP를 통하여 일어남을 밝혔다.

3. 상황버섯에 의한 metallothionein 발현촉진 기술

본 과제를 통하여 상황버섯의 베타-글루칸에 의하여 마우스의 간에서 metallothionein (MT) 유전자의 발현이 증가하였으며, 증가된 MT 유전자에 의하여 체내의 중금속 배출이 촉진됨을 발견하였다. 이러한 기술은 다음과 같은 분야에 기여할 수 있을 것이다.

가. 독성 중금속의 체외배출 촉진 분야

나. 세포내 금속이온의 항상성 유지

다. 세포내 Zn 이온의 항상성 유지

라. 체내 Cu 이온의 해독촉진 분야

제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

제 1 절 연구결과의 활용계획

1. FMO 유전자의 발현촉진 기술

상황버섯의 베타-글루칸이 FMO 유전자의 발현을 10배 이상 촉진시켰으므로 다음과 같이 활용할 예정이다.

가. 기술이전: 애완동물 또는 축사동물의 사료첨가제로써 기업에 기술을 이전하여 악취 제거제로 개발하고자 함. 뿐만 아니라 체내 잔류농약의 배설촉진제로도 기술을 이전할 예정임. 이러한 기술은 이미 국내에 특허로 신청하여 심사중에 있으며, 특허등록이 완료되면 기술이전에 더욱 유리하게 될 것이다.

나. 논문 투고: FMO 발현촉진에 의한 소변중의 악취물질인 TMA의 분해 촉진에 관하여 추가로 논문을 투고할 예정임.

2. Corin 효소의 발현촉진 기술

추가연구 필요: 상황버섯의 베타-글루칸이 실험동물에서 Corin 효소의 발현을 촉진하였으므로 항암작용과 혈압저하 작용의 기전을 더욱 구체적으로 규명하고자 함.

3. 중금속 배출 타깃 기술

체내 중금속 배출에 대한 안전한 기술이 많지 않으므로 상황버섯을 비롯한 다양한 버섯류의 베타-글루칸에 대하여 중금속배출에 관한 과제를 추진예정임.

제 2 절 추가연구의 필요성

1. ANP의 생성촉진 연구

상황버섯의 베타-글루칸은 실험동물에서 Corin 효소의 발현을 촉진시켰으며, 이로 인하여 ANP의 생성이 증가되었다. 그러나 ANP의 종류가 다양하여 정확히 어떤 ANP가 증가하였는지를 밝히는 과제가 남아있다. 이러한 분야를 지속적으로 연구를 계속하고 싶음.

2. 윈트(Wnt)와 관련성 연구

상황버섯의 베타-글루칸에 의하여 생성된 ANP가 윈트(Wnt) 수용체와 경쟁적으로 작용하여 윈트(Wnt)의 신호전달을 차단한다면 윈트(Wnt) inhibitor를 사용하여 정확한 작용기전을 규명하고 싶음.

제 3 절 기업화 추진방안

1. 애완동물의 소변악취 저감용 사료개발

상황버섯의 베타-글루칸 분획을 첨가한 애완동물의 사료를 개발하여 소변중의 악취를 저감시켜 악취없는 애완동물 가정에 도움을 주고자 함.

2. 가축의 악취 저감사료 개발

상황버섯의 추출물을 가축의 사료에 첨가하여 축사에서 발생하는 악취를 저감시키는 가축사료를 개발하고자 함. 현재 가축사료시장의 규모는 빠른 속도로 증가하고 있으므로 이에 대한 첨단사료의 개발이 절실한 실정이다.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>1. 다양한 버섯상품 출시확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - Solomon P. Wasser 교수 (이스라엘 하이파대학 진화환경생물학과) 기조강연 발표 - 일시: 2015. 8. 25 (남미 콜롬비아 마니잘레스) - 국제약용버섯학회지 (IJMM)의 편집위원장인 Wasser교수의 기조강연에서 전세계에 버섯을 이용한 다양한 제품이 출시되고 있음을 알게 되었음. 이러한 제품을 이스라엘의 버섯박물관에 전시하고 있음. <p>2. 버섯의 임상실험 진행 파악</p> <ul style="list-style-type: none"> - Catalina Fernandez de Ana 사장 (스페인 Hifas da Terra S.L. 회사) - 일시: 2017. 9. 27. (IMMC9, 이태리 팔레르모) - Catalina Fernandez de Ana 사장은 균학자인 부친의 영향으로 어려서 버섯과 친숙하게 되어 지금은 버섯으로 다양한 제품을 생산하는 거대 회사의 사장이 되었으며, 현재는 10종의 버섯에 대하여 임상실험을 진행하고 있음. <p>3. 중국의 독버섯 도감 기증받음</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tolgor Bau 교수 (중국 길림농업대학) - 일시: 2017. 9. 27. (IMMC9, 이태리 팔레르모) - 내용: 중국의 독버섯의 작용과 사진을 실은 독서섯 책자의 저자로부터 “독버섯: 확인 및 중독치료”(2016년, 총 308 페이지) 라는 칼라책자를 기증받음. 원저자로부터 한국에서 번역하여 출간하여도 좋다는 승낙을 받음. 중국 출판사의 승인이 필요함. <p>4. 독일의 균학자와 버섯성분 활용방법 습득</p> <ul style="list-style-type: none"> - Urlike Lindequist 교수 (독일 Greifswald 대학교 생물학과) - 일시: 2017. 9. 25. (IMMC9, 이태리 팔레르모) - 독일에서 채집한 2종의 버섯 (Agaricus ostoyae와 Tricholoma populinum)으로부터 알러지 예방성분을 분리하였는데 Agaricus ostoyae 버섯에서 탈과립을 억제하는 성분으로 melleolide H와 J를 분리하였음. 알러지 또는 아토피억제 성분은 본인의 관심연구주제이기도 함으로 많은 도움이 되었음. 	

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
○ 보안등급분류: 일반과제			
보안등급분류	일반과제		
결정사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수 량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장 비 등록번호
서울시 립대학 교	본 과제를 3년간 수 행하는 전 과정에서 연구시설 또는 장비 를 구입한 것이 전 혀 없음.	해당없음	0	해당없 음	0	해당없음	해당없음	해당없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호	D-11
------	------

1. 연구실 안전관리 추진

가. 실험실 출입문을 투시형으로 교체

2017년에 실험실의 출입문을 외부에서 투시할 수 있는 투시형 으로 교체하였음. 따라서 내부에서 화재, 사고 등이 발생하였을 경우에 신속히 내부상황을 파악 할 수 있게 되었다.

나. 실험실 일일 점검표 작성 및 실험실 배치도 작성 및 부착

실험실의 안전을 위하여 실험실 주 출입문에 일일 점검표를 작성해왔음. 또한 외부에서 실험실내의 배치를 쉽게 파악할 수 있도록 배치도를 부착하여 화재등의 비상시에 내부상황을 신속히 파악할 수 있도록 하였음.

다. 실험폐기물관리 준수

실험실에서 발생한 실험폐기물은 별도로 관리하여 매달 2회씩 업체에 인계하여 환경 오염을 방지해 왔음.

라. 연구실험실 안전장비 구매

휘발성유기화합물(VOCs)을 밀폐형시약장을 시립대 시설과에서 구입하여 제공해 왔기 때문에 화재예방, 건강관리 등에 크게 도움이 되었음.

2. 연구원 특수건강검진 실시 및 보험가입

서울시립대에서는 본부차원에서 학부생과 대학원생의 특수건강검진을 실시해 왔으며, 아래는 시립대 전체의 보험가입된 학생수를 나타내는 표임.

보험 가입 기간 (2013 - 2014)	서울시립대학교 전체			합계
	학부생	대학원생	수료생	
13. 7. 31. - 14. 7. 31.	4,478	1,219	386	6,083

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관 명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Induction of Flavin-containing Monooxygenase in Mice by Oral Administration of <i>Phellinus baumii</i> (Agaricomycetes) Extract	서울립대학교	교신저자	International Journal of Medicinal Mushrooms	1.104 (5년 평균)	2016. 09. 20.	단독사사	SCIE
2	논문	Activation of NADPH Oxidase by Beta-Glucan of <i>Phellinus baumii</i> Pilat (Hymenochaetaceae, Higher Basidiomycetes) in RAW264.7 Cells	서울립대학교	교신저자	International Journal of Medicinal Mushrooms	1.104 (5년 평균)	2016. 12. 20. (예정)	단독사사	SCIE
3	특허	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 N-, S-, P- 함유 생체외래물질 분해 촉진용 조성물	서울립대학교	발명자	대한민국		2015. 04. 02		출원 심사중
4	특허	상황버섯 추출물 또는 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 약취저감용 조성물	서울립대학교	발명자	대한민국		2015. 04. 02		출원 심사중
5	초청강연	Novel Antihypertensive Mechanism of <i>Phellinus baumii</i> beta-Glucan by Induction of Corin in Mice	서울립대학교	강연 발표	The 9 th International Medicinal Mushrooms Conference		2017. 09. 26		초청연사, 조직위원 (한국대표)
6	편집	International Journal of Medicinal Mushrooms	서울립대학교	편집 위원			2016 ~ 2017		

제 11 장 기타사항

코드번호	D-13
<p>○ 연구업적중 특허출원 2건은 모두 달성하였으나 현재 대한민국 특허청에서 심사중에 있음. 출원한 2건중 최소 1건 이상은 특허등록될 것으로 예상함.</p>	

제 12 장 참고문헌

	코드번호	D-14
참고문헌		
Berg JZ, von Weymarn LB, Thompson EA, Wickham KM, Weisensel NA, Hatsukami DK, Murphy SE. UGT2B10 genotype influences nicotine glucuronidation, oxidation, and consumption. <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.</i> 2010;19(6):1423-31.		
Bouley R. Corin: a key protein of an adaptive renal mechanism to respond to salt variation? <i>Kidney Int.</i> 2012 Jul;82(1):7-8.		
Dai YC, Zhou LW, Cui BK, Chen YQ, Decock C. Current advances in <i>Phellinus sensu lato</i> : medicinal species, functions, metabolites and mechanisms. <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 2010;87(5):1587-93.		
Hanna ST. Nicotine effect on cardiovascular system and ion channels. <i>J Cardiovasc Pharmacol.</i> 2006 Mar;47(3):348-58.		
Hernandez D, Janmohamed A, Chandan P, Phillips IR, Shephard EA. Organization and evolution of the flavincontaining monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene clusters. <i>Pharmacogenetics</i> 2004;14:117 - 30.		
Hwang BS, Lee IK, Choi HJ, Yun BS. Anti-influenza activities of polyphenols from the medicinal mushroom <i>Phellinus baumii</i> . <i>Bioorg Med Chem Lett.</i> 2015;25(16):3256-60.		
Kaitu'u-Lino TJ, Ye L, Tuohey L, Dimitriadis E, Bulmer J, Rogers P, Menkhorst E, Van Sinderen M, Girling JE, Hannan N, Tong S. Corin, an enzyme with a putative role in spiral artery remodeling, is up-regulated in late secretory endometrium and first trimester decidua. <i>Hum Reprod.</i> 2013;28(5):1172-80.		
Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from <i>Phellinus linteus</i> enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. <i>J Ethnopharmacol.</i> 2004;95:69 - 76.		
Kim YH, Bae YJ, Kim HS, Cha HJ, Yun JS, Shin JS, Seong WK, Lee YM, Han KM. Measurement of Human Cytochrome P450 Enzyme Induction Based on Mesalazine and Mosapride Citrate Treatments Using a Luminescent Assay. <i>Biomol Ther (Seoul).</i> 2015;23(5):486-92.		
Lee IK, Han MS, Lee MS, Kim YS, Yun BS.: Styrylpyrones from the medicinal fungus <i>Phellinus baumii</i> and their antioxidant properties. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 20(18): 5459-61 (2010).		
Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi <i>Phellinus</i> and <i>Inonotus</i> spp., and their medicinal importance. <i>J Antibiot (Tokyo).</i> 2011;64(5):349-59.		

- Lee JH, Lee JS, Kim YR, Jung WC, Lee KE, Lee SY, Hong EK.: Hispidin isolated from *Phellinus linteus* protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in pancreatic MIN6N β -cells. *J. Med. Food* 14(11):1431-8 (2011).
- Lee SW, Song JG, Hwang BS, Kim DW, Lee YJ, Woo EE, Kim JY, Lee IK, Yun BS. Lipoxygenase Inhibitory Activity of Korean Indigenous Mushroom Extracts and Isolation of an Active Compound from *Phellinus baumii*. *Mycobiology*. 2014;42(2):185-8.
- Li H, Zhang Y, Wu Q. Role of corin in the regulation of blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(2):67-73.
- Ogórek M, Gąsior Ł, Pierzchała O, Daszkiewicz R, Lenartowicz M. Role of copper in the process of spermatogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71:663-683.
- Saghazadeh A, Rezaei N. Systematic review and meta-analysis links autism and toxic metals and highlights the impact of country development status: Higher blood and erythrocyte levels for mercury and lead, and higher hair antimony, cadmium, lead, and mercury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79(Pt B):340-368.
- Sliva D, Jedinak A, Kawasaki J, Harvey K, Slivova V. *Phellinus linteus* suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signalling. *Br J Cancer*. 2008;98:1348 - 56.
- Su HH, Chu YC, Liao JM, Wang YH, Jan MS, Lin CW, Wu CY, Tseng CY, Yen JC, Huang SS. *Phellinus linteus* mycelium alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury through autophagic regulation. *Front Pharmacol*. 2017;8:175.
- Thirumorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*. 2011;9:54.
- Wang WH, Wu FH, Yang Y, Wu N, Zhang JS, Feng N, Tang CH. Hypoglycemic Effect of Ethanol and Ethyl Acetate Extract of *Phellinus baumii* Fruiting Body in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:783460.
- Yayeh T, Lee WM, Ko D, Park SC, Cho JY, Park HJ, Lee IK, Kim SH, Hong SB, Kim S, Yun BS, Rhee MH. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract alleviated collagen type II induced arthritis in DBA/1 mice. *J Nat Med*. 2013;67(4):807-13.
- Zhang J, Cashman JR. Quantitative analysis of FMO gene mRNA levels in human tissues. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(1):19-26.
- Zhang ZF, Lv GY, Song TT, Jin QL, Huang JB, Fan LF, Cai WM. Comparison of the preliminary characterizations and antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Phellinus baumii* growth on different culture substrates. *Carbohydr Polym*. 2015;132:397-9.

Zhoua Y and Wu Q. Role of Corin and Atrial Natriuretic Peptide in Preeclampsia. Placenta. 2013; 34(2): 89 - 94.

Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH, Chen CY. Phellinus linteus activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. Br J Cancer. 2007;96:583 - 90.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.